

**Isolierung und Charakterisierung
des Dihydropyridin-Rezeptors
aus Kaninchen-Skelettmuskel**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

UWE KANNGIESSER

Bochum 1988



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546619_0018

**Isolierung und Charakterisierung
des Dihydropyridin-Rezeptors
aus Kaninchen-Skelettmuskel**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

UWE KANNGIESSER

Bochum 1988

Tag der mündlichen Prüfung: 1. Juli 1988

Vorsitzender:	Prof. Dr. W.R.Roth
1. Prüfer :	Prof. Dr. O.Pongs
2. Prüfer :	Prof. Dr. B.Benecke
3. Prüfer :	Prof. Dr. G.Schneider

Ich danke Herrn Prof. Dr. Olaf Pongs für die Überlassung des Themas und für seine fortwährende, hilfreiche Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. Peter Bellemann danke ich für die Überlassung der radioaktiv markierten Liganden und insbesondere für Anregungen, die bei der Durchführung der Arbeit geholfen haben.

Herrn Prof. Dr. Günter Boheim möchte ich dafür danken, daß er mich in die Elektrophysiologie eingeführt hat.

Nicht zuletzt möchte ich Herrn Dr. Neil Brandt dafür danken, daß er mich in die Technik der Druckbehandlung von Membranen eingeführt hat. Herrn Dr. Hans-Hermann Kiltz und Frau Dipl.-Chem. Petra Hirschberg danke ich für ihr Interesse und ihre Kritikbereitschaft an dieser Arbeit sowie Herrn Klaus Grabert für die Durchführung der photographischen Arbeiten.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dipl.-Chem. Peter Nalik für seine Unterstützung bei den Experimenten zur Rezeptor-Isolierung und Photoaffinitätsmarkierung.

Inhaltsverzeichnis

<u>Einleitung</u>	01
<u>Experimenteller Teil</u>	07
1.0.0. Isolierung von transversen Tubuli Membranen aus Kaninchen-Skelettmuskel	07
1.0.1. Calciumphosphat-Methode	07
1.0.2. Ribl-Pressen	09
1.1.0. Isolierung des ^3H -DHP-Rezeptorkomplexes	10
1.1.1. Solubilisierung des DHP-Rezeptors mit Digitonin	10
1.1.2. Affinitätschromatographie (WGA-Sephadex I)	11
1.1.3. Ionenaustauschchromatographie (DEAE-Sephadex A-25)	12
1.1.4. Affinitätschromatographie (WGA-Sephadex II)	13
1.1.5. Isolierung des DHP-Rezeptors	14
1.2.0. Bindungstest	14
1.2.1. Calciumkanal Liganden	14
1.2.2. Markierung des membrangebundenen Rezeptors	16
1.2.3. Messung des Digitonin-solubilisierten ^3H -DHP-Rezeptorkomplexes	17
1.2.4. Analytik des DHP-Rezeptors	17
1.3.0. Photoaffinitätsmarkierung	18
1.3.1. T-Tubuli Membranen	18
1.3.2. Angereicherter Rezeptor	19
1.4.0. Limitierte Proteolyse	20
1.5.0. Sonstige Methoden	20
<u>Ergebnisse</u>	25
2.0.0. Membranpräparationen	25
2.1.0. Charakterisierung der Ligand-Rezeptor Wechselwirkung	29
2.2.0. Solubilisierung mit Digitonin	33
2.3.0. Zonenzentrifugation	37
2.4.0. Affinitätschromatographie	39
2.5.0. Isolierung des DHP-Rezeptors	40
2.6.0. Charakterisierung des aufgereinigten DHP-Rezeptors	45

2.7.0.	Affinitätsmarkierung	48
2.7.1.	Photoaffinitätsmarkierung mit ^3H -Azidopin	48
2.7.2.	Limitierte Proteolyse	51
2.7.3.	Photoaffinitätsmarkierung mit ^3H -Nimodipin	54
2.8.0.	Modulation der DHP (Agonist/Antagonist)-Bindung	56

Diskussion

65

Zusammenfassung

76

Literaturverzeichnis

77

Abkürzungen

Azldopin	1,4-Dihydro-2,6-Dimethyl-4-(2-trifluormethylphenyl)-3,5-pyridin-carbonsäure-3-ethyl-5-(N-4-azidobenzoylaminoethyl)-ester
Bay K 8644	1,4-Dihydro-2,6-Dimethyl-3-nitro-4-(2-trifluormethylphenyl)-pyridine-5-carbonsäure-methyl-ester
BSA	Rinderserumalbumin
DHP	Dihydropyridin
DTT	Dithiothreitol
Diltiazem	cis-(+)-5-(2-Dimethylaminoethyl)-2,3,4,5-tetrahydro-2-(4-methoxyphenyl)-4-oxo-1,5-benzothiazepin-3-ylacetat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	1,2-Bis-(2-aminoethoxy-ethan)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
GABA	γ -Aminobuttersäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
NAGA	N-Acetyl-D-Glucosamin
NEMA	N-Ethylmaleimid
Nimodipin	1,4-Dihydro-2,6-Dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-3,5-pyridincarbonsäure-3-isopropyl-5-(2-methoxyethyl)-ester
Nitrendipin	1,4-Dihydro-2,6-Dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-3,5-pyridincarbonsäure-3-ethyl-5-methyl-ester
PAA	Polyacrylamid
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PN 200-110	1,4-Dihydro-2,6-Dimethyl-4-(2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)-3,5-pyridin-carbonsäure-3-isopropyl-5-methyl-ester
PPO	2,5-Diphenyloxazol
SDS	Natriumdodekylsulfat
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
t-Tubuli	transverse Tubuli
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
Verapamil	α -Isopropyl- α -[(N-methyl-N-homoveratryl)- γ -aminopropyl]-3,4-dimethoxyphenylacetonitril
WGA	Weizenkeim Agglutinin (Wheat Germ Agglutinin)

Chemikalien

<i>Antipain</i>	SIGMA
<i>Aprotinin</i>	SIGMA
<i>ATP</i>	BOEHRINGER MANNHEIM
<i>α-Chymotrypsin [EC 3. 4. 21. 1]</i>	MERCK
<i>DEAE-Sephadex A-25</i>	SIGMA
<i>Digitonin</i>	FLUKA
<i>Diltiazem</i>	BAYER
<i>γ-Globulin</i>	SIGMA
<i>NAGA</i>	SIGMA
<i>PEG</i>	FLUKA
<i>Pepstatin A</i>	SIGMA
<i>PMSF</i>	SIGMA
<i>Verapamil</i>	SIGMA
<i>V₈-Protease [EC 3. 4. 21. 19]</i>	PAESEL
<i>Quickszint 2000</i>	ZINSSER
<i>WGA-Sepharose 6MB</i>	SIGMA

Alle anderen Chemikalien waren von Sigma, Merck, Roth oder Serva.

Radioaktive Verbindungen (NEN)

<i>[³H]-Nimodipin</i>	(160 Ci/mmol)
<i>[³H]-Nitrendipin</i>	(71,6 Ci/mmol)
<i>[³H]-Azidopin</i>	(53 Ci/mmol)
<i>[³H]-PN 200-110</i>	(70 Ci/mmol)
<i>[³H]-Bay K 8644</i>	(82,9 Ci/mmol)

Die radioaktiven Verbindungen wurden freundlicherweise von der Firma Bayer AG (Wuppertal) zur Verfügung gestellt.

Einleitung

Jede Zelle muß zur Erhaltung ihrer Lebensfunktionen in der Lage sein, einen unkontrollierten Stoffaustausch zwischen dem intra- und extrazellulären Raum zu verhindern. Deshalb wurde schon früh eine als Diffusionsbarriere wirkende *Plasmamembran* als Zelloberfläche postuliert (Overton, 1902). Aber erst durch das *fluid mosaic membrane* Modell von Singer und Nicolson (1972) konnten die an biologischen Membranen beobachteten Effekte zufriedenstellend erklärt werden. Das Grundgerüst der Membran wird durch einen Lipidbilayer gebildet (Ringsdorf et al., 1988), der auch die eigentliche Diffusionsbarriere darstellt. In diesen Lipidbilayer integrierte Membranproteine sind verantwortlich für die Steuerung von Teilen des Zellstoffwechsels (Goldberg, 1975), die Aufrechterhaltung einer bestimmten Zellmorphologie (Branton et al., 1981) oder die Auslösung und Weiterleitung von elektrischen Phänomenen (Hille, 1984). Bei einem elektrischen Reiz kommt es zur Depolarisation, das Membranpotential bricht zusammen. Diese Depolarisation entspricht einem Einstrom von Natriumionen in die Zelle (Abb. 1). Danach kommt es zu einem zweiten Einstrom von Calciumionen, der das Plateau des Aktionspotentials bildet. Die Repolarisation wird durch einen Auswärtsstrom von Kaliumionen eingeleitet (Shamoo, 1985).

Der Transport von Ionen durch die Membran hindurch kann entweder über aktive (Carrierproteine) oder passive (Kanalproteine) Transportsysteme erfolgen (Alberts et al., 1983). Die Kanalproteine zeichnen sich gegenüber den Carrierproteinen durch eine 4fach größere Wechselzahl aus (10^7 Ionen/Sekunde; Hille, 1984). Dieser Unterschied zeigt sich in der Anwendung dieser Transportsysteme durch die Zelle. Die Carrierproteine stabilisieren bzw. regenerieren das Membranpotential der ruhenden Zelle, wogegen die mit der Erregung der Membran verbundenen, kurzfristig sehr hohen Ionenströme durch Kanalproteine fließen. Letztere lassen sich in ligand- und spannungsgesteuerte Kanäle unterscheiden.

Zu den ligandgesteuerten zählen der natriumpermeable Acetylcholinrezeptor (Hucho, 1986), der chloridpermeable Glycinrezeptor (Betz, 1987) und der chloridpermeable GABA-Rezeptor (Stephenson, 1988). Aus den inzwischen bekannten Primärsequenzen (Kubo et al., 1986; Grenningloh et al., 1987; Schofield et al., 1987) lassen sich durch



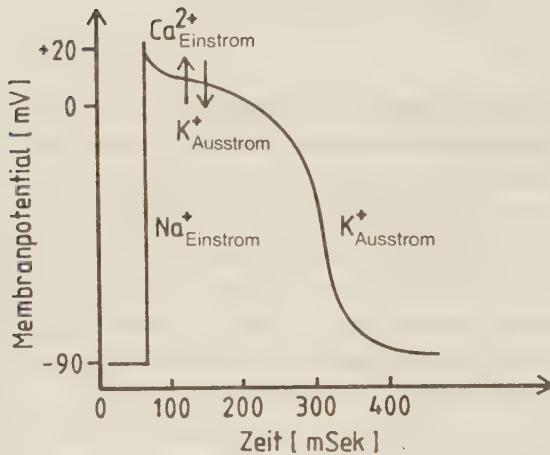


Abb. 1: Schematisches Aktionspotential einer Muskelfaser (aus Shamoo, 1985).

Sequenz- und vor allem Hydrophobizitätsvergleiche (Kyte & Doolittle, 1982) verwandte Strukturmerkmale erkennen. Danach sind ligandgesteuerten Ionenkanälen vier hydrophobe, membrandurchspannende Segmente (M1 - M4) und ein langer, N-terminaler, extrazellulärer Bereich gemeinsam. Zu den spannungsgesteuerten Kanälen gehören der Natriumkanal (Catterall, 1986), der Calciumkanal (Hurwitz, 1986 ; Hagiwara & Byerly, 1981) und der Kaliumkanal (Yellen, 1987). Ein Vergleich der Primärsequenzen des Natrium- und Kaliumkanals (Baumann et al., 1987 ; Timpe et al., 1988 ; Noda et al., 1984 ;) zeigt Bereiche hoher Sequenzhomologie, die sich beim Natriumkanal viermal wiederholen. Jeder dieser Bereiche enthält sechs hydrophobe, membrandurchspannende Segmente (S1 - S6). Die hohen Sequenzhomologien sowohl bei den ligand- als auch bei den spannungsgesteuerten Kanälen sind auf den Bereich der hydrophoben Segmente, also den kanalbildenden Teil (die Pore), konzentriert.

Der passive Transport von Ionen durch kanalbildende Strukturen beruht auf einer asymmetrischen Verteilung der Ionenkonzentrationen (Nernst, 1888). In Tabelle I sind die Ionenkonzentrationen einer Muskelzelle gezeigt (Hille, 1984). Für das

Calciumion steht einer extrazellulären Konzentration von 1,5 mM eine intrazelluläre Konzentration von $< 0,1 \mu\text{M}$ gegenüber. Für kein anderes Ion existiert über der Membran ein so großer elektrochemischer Gradient. Gleichzeitig findet auch kein anderes Ion eine so vielfältige Verwendung in der Zelle. So wird es bei der Kontrolle des Cilienschlages in Paramecium und anderen Ciliaten eingesetzt (Eckert & Brehm, 1979), steuert die Sekretion von chemischen Botenstoffen (Akerman & Nicholls, 1983; Baker & Knight, 1984), koppelt Membrandepolarisation und Muskeleregung (Rüegg, 1987; Podolsky, 1975) und spielt eine bedeutende Rolle bei der Plastizität

Tabelle I

Freie Ionenkonzentrationen einer Muskelzelle (Hille, 1984)

Ion	Konzentration (mM)		$[\text{Ion}]_{\text{außen}}/[\text{Ion}]_{\text{innen}}$
	Extrazelluläre	Intrazelluläre	
Na^+	145	12	12
K^+	4	155	0,026
Ca^{2+}	1,5	$< 10^{-4}$	> 15.000

des Nervensystems (Kandel, 1981). Dementsprechend wichtig ist eine präzise Regulation der intrazellulären Calciumkonzentration (Somlyo, 1984; Taylor, 1985). Diese Kontrolle wird über Puffersysteme, Calciumpumpen und Calciumkanäle ausgeübt.

Calciumströme fand man erstmals an Crustaceenmuskeln (Fatt & Katz, 1953). Vor allem durch elektrophysiologische Messungen existieren inzwischen detaillierte Kenntnisse über calciumpermeable Kanäle (Reuter, 1983; Tsien, 1983). Unter physiologischen Bedingungen sind die Calciumkanäle selektiv für Calciumionen (Tsien et al., 1987). In calciumfreien Lösungen (Calciumkonzentration $< 10^{-8} \text{ M}$) verlieren sie ihre Selektivität und können auch von anderen Ionen (Mg^{2+} , Li^+ , Na^+ , K^+) durchquert werden, wobei diese um eine gemeinsame Bindungsstelle kompetieren (Almers et al., 1984; Almers & McCleskey, 1984). Die Kanäle besitzen mindestens zwei Kation-Bindungsstellen (Tsien et al., 1987), von denen eine hochselektiv ($K_D \sim \mu\text{M}$; Almers et al., 1984) und eine weniger spezifisch ($K_D \sim \text{mM}$; Hess & Tsien, 1984) für Calcium ist.

Es gibt mindestens drei verschiedene spannungsabhängige Calciumkanäle (Nowicky et al., 1985), deren Eigenschaften in Tabelle II gegenübergestellt sind. Die Calciumkanäle (L-, N- und T-Typ) unterscheiden sich in ihren Aktivierungs- und Inaktivierungskinetiken und vor allem in der spezifischen Blockade des Stromflusses. Die Kanäle vom L- und N-Typ lassen sich durch anorganische Ionen (z.B.: Cadmium)

Tabelle II

Gemeinsamkeiten und Unterschiede der T-, N- und L- Calciumkanäle

Calciumkanal	T (transient)	L (long-lasting)	N (neuron)
Kanalleitwert (mit Ba^{2+} als Ion)	8 pS	25 pS	13 pS
Aktivierung	Aktivierung durch negative Membran- potentiale -90mV $\longrightarrow$ -40mV	Aktivierung durch starke Depolarisation -90mV $\longrightarrow$ 0mV	
Inaktivierung [$t_{1/2}$]	25 mSek.	einige 100 mSek.	~ 25 mSek.
Vorkommen	[——— Skelettmuskel, Herzmuskel ———] [——— sensorische Nervenzellen ———]		
Blockierbarkeit	[——— sensitiv zu anorg. Ionen ———] (z.B. Cadmium) [——— sensitiv zu ω -Conotoxin ———] [— 1,4-Dihydropyridine —] (DHP)		

oder durch Peptidtoxine (ω -Conotoxine) blockieren (Olivera et al., 1984, 1985), der T-Kanal nicht. Ausschließlich die L-Typ-Kanäle sind durch 1,4-Dihydropyridine (Calciumkanal-Agonisten und -Antagonisten), die ihre Wirkung über die Bindung an ein Rezeptorprotein (Janis et al., 1985 ; Bellemann, 1985 ; Triggie & Janis, 1984) ausüben, modulierbar. Die Bindung des Calciumkanal-Agonisten Bay K 8644 an den Dihydropyridin (DHP)-Rezeptor stabilisiert den offenen Zustand des L-Typ-Kanals

(Nowycky et al., 1985), und die Bindung des Calciumkanal-Antagonisten Nimodipin stabilisiert einen geschlossenen Zustand des L-Typ-Kanals (Nilius et al., 1985). Die Blockade des Calciumeinstroms durch Calciumkanal-Antagonisten wird bereits klinisch bei koronaren Herzkrankheiten, insbesondere der vasospastischen Form, angewandt (Stone et al., 1980 ; Fleckenstein, 1977).

Durch elektrophysiologische Messungen konnte gezeigt werden, daß der Calciumkanal ein integraler Bestandteil des DHP-Rezeptors ist (Flockerzi et al., 1986 b). Weiterhin zeigt die Primärstruktur des DHP-Rezeptors (Tanabe et al., 1987) in den hydrophoben, membrandurchspannenden Bereichen signifikante Sequenzhomologien zum Natrium- und Kaliumkanal, weshalb der DHP-Rezeptor vermutlich mit dem Calciumkanal identisch ist.

DHP-Rezeptoren sind neben dem Herzmuskel in vielen Geweben gefunden worden (Bellemann et al., 1981 ; Gould et al., 1982 ; Bellemann et al., 1983 ; Ferry & Glossmann, 1982). Die reichhaltigste Quelle an DHP-Rezeptoren sind die t-Tubuli Membranen des Skelettmuskels (Fosset et al., 1983). Allerdings ist dort die Zahl der DHP-Rezeptoren mit der Zahl der Calciumkanäle nicht korrelierbar (Schwartz et al., 1985). Nur ~ 1% der DHP-Rezeptoren entsprechen blockierbaren Calciumkanälen. Diese Diskrepanz wird einerseits auf die Spannungsabhängigkeit der DHP-Bindung zurückgeführt, wonach die Dihydropyridine mit hoher Affinität nur an den inaktivierten Zustand des Kanals binden (Bean, 1984 ; Rios & Brum, 1987). Andererseits kann dem DHP-Rezeptor im Skelettmuskel neben seiner Funktion als Kanalprotein eine weitere Rolle bei der Kopplung zwischen Erregung und Kontraktion des Muskels zugeordnet werden. Der DHP-Rezeptor kann das Signal eines ankommenden Aktionspotentials an interne Calciumspeicher (Sarkoplasmatisches Retikulum) weitergeben, die daraufhin Calciumionen ins Cytoplasma freisetzen (Lai et al., 1988), ohne dabei selbst für Calciumionen permeabel zu werden (Rios & Brum, 1987).

Die t-Tubuli Membranen des Skelettmuskels sind auf Grund ihrer ungewöhnlich hohen Rezeptordichte bevorzugte Objekte zur Isolierung des DHP-Rezeptors (Curtis & Catterall, 1984 ; Borsotto et al., 1984 b). Die interessanteren, aber auch ungleich selteneren Rezeptoren aus dem Herzmuskel und dem Gehirn, an denen anders als im Skelettmuskel durch DHP-Bindung induzierbare physiologische Wirkungen nachweisbar sind (Fleckenstein, 1977 ; Spedding, 1987), hofft man mit Hilfe von Antikörpern gegen den leichter zugänglichen DHP-Rezeptor aus Skelettmuskel näher charakterisieren zu

können. Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit das DHP-Rezeptorprotein isoliert und charakterisiert werden. Als Ausgangsmaterial wurden t-Tubuli Membranen aus Kaninchen-Skelettmuskel verwandt.

Experimenteller Teil

1.0.0. Isolierung von transversen Tubuli Membranen aus Kaninchen-Skelettmuskel

1.0.1. Calciumphosphat-Methode

Puffer-A: 20 mM Tris/Maleat, pH 7.4
300 mM Sucrose
1 μ M Pepstatin A
1 mM PMSF

Puffer-B: 50 mM KH_2PO_4 , pH 7.4
5 mM MgCl_2
2 mM ATP
0,15 mM KCl
0,3 mM CaCl_2
1 μ M Pepstatin A
1 mM PMSF

Die Kaninchen wurden durch einen Schlag auf den Nacken betäubt. Nach Durchtrennen der Halsschlagader läßt man sie ausbluten und entnimmt die Oberschenkel- und Rückenmuskulatur, die sofort auf Eis gelegt wurde. Die folgenden Schritte (Roseblatt, 1981) wurden, wenn nicht anders erwähnt, bei 4° C durchgeführt. Das Fleisch wurde sorgfältig von Sehnen und Bindegewebe sowie noch rotem Muskelfleisch (Erythrocyten) befreit und dabei in kleine Stücke geschnitten. In einem Waring Blendor wurde das Fleisch (400g) mit der vierfachen Menge Puffer-A (w/v) homogenisiert (30 Sek. bei Stufe 1, 20 Sek. bei Stufe 2 und 5 Sek. bei Stufe 3, unterbrochen von 20 Sek. Pause zum Abkühlen). Nicht homogenisierte Gewebs- und Zellreste wurden abzentrifugiert (G3-Rotor, Sorvall, 3300xg, 20 Min.). Der gelbliche Überstand wurde über eine Lage Gaze dekantiert und rezentrifugiert (G3-Rotor, Sorvall, 10.000xg, 20 Min., Abtrennung der Mitochondrien). Um

nichtintegrale Proteine von der Membranoberfläche zu lösen, wurde der Überstand auf 0,5M KCl eingestellt. Schließlich wurden die Membranen pelletiert (A641-Rotor, Sorvall, 125.000xg, 34 Min.), gewaschen und in wenig Puffer-A suspendiert (mehrmaliges Durchpressen durch eine 0,7-0,9 mm Kanüle). Die Mikrosomen-Suspension wurde auf einem diskontinuierlichen Sucrosegradienten aufgetrennt. Der Gradient bestand aus vier Sucrose-Stufen: 5ml 50%, 15ml 40%, 10ml 35% und 5ml 25% (w/v) Sucrose in Puffer-A (Abb. 2). Die Oberflächenmembran (OM) an der 25/35%igen Sucrose-Interphase wurde mit einer Pasteur-Pipette abgenommen und mit Puffer-A gewaschen (A641-Rotor, 125.000xg, 34Min.). Die pelletierte Membran wurde in wenig Puffer-A suspendiert und mit Puffer-B auf 0,1 mg Protein/ml Lösung verdünnt. Nach einer 20minütigen Inkubation bei 22°C (Beladen von kontaminierenden SR(Sarkoplasmatisches Retikulum)-Vesikeln mit Calciumphosphat) wurden die Membranen pelletiert (A641-Rotor, 125.000xg, 34 Min.), in wenig Puffer-B (2ml) resuspendiert und auf einem zweiten diskontinuierlichen Sucrosegradienten aufgetrennt. Dieser Gradient bestand aus drei Sucrose-Stufen: 4ml 63%, 4ml 50% und 4ml 35%iger (w/v) Sucrose in Puffer-A (Abb. 2). Die auf das 35%ige Sucrose-Kissen sedimentierte Bande (transverse Tubuli) wurde abgenommen, mit Puffer-A gewaschen, suspendiert und bei -196°C gelagert.

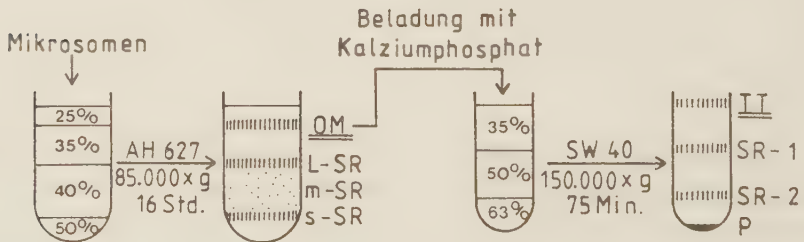


Abb. 2: Calciumphosphat-Methode zur Isolierung von t-Tubuli aus Muskelmikrosomen. Die Oberflächenmembranen (OM) wurden über einen Sucrose-Dichtegradienten vom Sarkoplasmatischen Retikulum (l = leichtes, m = mittleres und s = schweres SR) getrennt. In der OM-Bande liegen die t-Tubuli (TT) komplexiert mit Vesikeln von sarkoplasmatischem Ursprung (Triaden-Struktur) vor. Zur weiteren Trennung wurden die SR-Vesikel mit Calciumphosphat beladen und sedimentierten in dem zweiten Sucrosegradienten bei größerer Dichte als die t-Tubuli Membranen. Einzelheiten der Methode sind in 1.0.1. dargestellt.

1.0.2. *Ribi-Press*

Puffer-O: 250 mM Sucrose
0,2 mM EDTA

Puffer-P: 250 mM Sucrose
2 mM Histidin

Die Kaninchen (ca. 3kg schwere belgische Riesen) wurden, wie unter der Calciumphosphat-Methode (siehe 1.0.1.) beschrieben, getötet. Die Rückenmuskulatur wurde möglichst schnell freigelegt und die umgebenden Bindegewebshäute wurden vorsichtig entfernt, ohne den Muskel zu verletzen. In die noch intakten Muskelhälften wurden je 10-15ml Ringer-Lösung (120mM NaCl/5mM KCl/2mM CaCl_2 / 20mM Glukose/1mM Natriumphosphat, pH 7.4) injiziert (Lau et al., 1977), wobei die Kanüle (0,7-0,9mm Ø) parallel zum Rückgrat geführt wurde. Während die Spitze der Kanüle in den Muskel eindringt, sollte kontinuierlich gespritzt werden, so daß die Lösung möglichst breit verteilt wird. Dazu ist es erforderlich, an mehreren Stellen jeweils 1-2ml Ringers Lösung zu injizieren. Nach einer Inkubationszeit von 30-60 Minuten wurde der nun fast blutleere, sehr helle Muskel herausgetrennt und von noch rotem Fleisch befreit. Die folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Jeweils eine Muskelhälfte wurde mit 250ml Puffer-O in einem Waring Blendor homogenisiert (je vier mal für 30 Sek. auf Stufe 3, unterbrochen von 20 Sek. Pause zum Abkühlen). Das Homogenat wurde zentrifugiert (G3-Rotor, Sorvall, 8000xg, 15 Min.) und der Überstand wurde über vier Lagen Gaze filtriert. Aus dem Überstand wurden die Membranen sedimentiert (TI45-Rotor, 140.000xg, 1 Std.), zweimal mit Puffer-P gewaschen und in einem Dounce-Homogenisator resuspendiert. Dann wurden die Membranen durch einen linearen Sucrosegradienten zentrifugiert (15-50% (w/w) Sucrose in 2mM L-Histidin gelöst; SW28-Rotor, 72.000xg, 12 Std.). Die sichtbare, schwere Mikrosomen-Bande, die bei ca. 40% Sucrose sedimentiert, wurde mit einer Pasteur-Pipette abgenommen, pelletiert (TI45-Rotor, 140.000xg, 1 Std.) und mit Puffer-P gewaschen. Das Membran-Sediment wurde in Puffer-P resuspendiert und auf eine Konzentration von 10mg Protein/ml Lösung verdünnt. Das Aufbrechen der vorliegenden Triaden-Struktur in t-Tubuli Vesikel und SR-Membranen erfolgte

bei einem Druck von 15.000 psi (1 psi = 6.89 kPa) in einer Rib-Press (Rib Cell Fractionator, Mod. RF-1, Du Pont). Das Eluat wurde auf einem zweiten linearen Sucrosegradienten aufgetrennt (15-50% (w/w) Sucrose, SW28-Rotor, 72.000xg, 12 Std.). Die t-Tubuli, die als sichtbare, leichte Bande bei ca. 25% Sucrose sedimentieren, wurden mit einer Pasteur-Pipette abgenommen, mit Puffer-P gewaschen und bei -196°C aliquotiert gelagert.

1.1.0. Isolierung des ^3H -DHP-Rezeptorkomplexes

Der DHP-Rezeptor wurde aus t-Tubuli Membranen isoliert, deren Präparationen unter 1.0.1. und 1.0.2. beschrieben sind. Zur Isolierung wurden nur Membranen benutzt, die nicht länger als 4 Monate bei -196°C gelagert und die in dieser Zeit auch nie aufgetaut waren. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen der Membranen führte zu deutlichen Verlusten in der Bindungsaffinität von Dihydropyridinen. Sämtliche Manipulationen an den Membranen oder den solubilisierten Membranproteinen wurden bei 4°C durchgeführt, sofern es nicht anders erwähnt ist. Der DHP-Rezeptor wurde mit geringen Abweichungen nach dem Verfahren von Curtis & Catterall (1984) isoliert.

1.1.1. Solubilisierung des DHP-Rezeptors mit Digitonin

Puffer-F: 10 mM HEPES/Tris, pH 7.4
 185 mM KCl
 1% Digitonin
 1 μM Pepstatin A
 1 mM PMSF

Puffer-T: 10 mM HEPES/Tris, pH 7.4
 185 mM KCl
 1 μM Pepstatin A
 1 mM PMSF

Die aliquotiert eingefrorenen t-Tubuli Membranen wurden möglichst schnell aufgetaut und mit Puffer-T auf 1 mg Protein/ml verdünnt. Nach Zugabe von 5-10 nM ^3H -Nitrendipin oder ^3H -PN 200-110 wurde für 90 Min. bei 4°C inkubiert. Die Membranen wurden pelletiert (SW40-Rotor, Beckman, 200.000xg, 40 Min.) und in 1%iger Digitonin-Lösung (Puffer-F) mit einem Detergenz zu Protein Verhältnis von 5 : 1 (w/w) resuspendiert. Dazu wurde das Pellet mit einem Pistill gelockert, in einen Dounce-Homogenisator (S-Typ) überführt und über 40 Min. in mehreren Intervallen homogenisiert. Ungelöstes Material wurde pelletiert (SW40-Rotor, Beckman, 200.000xg, 50 Min.). Der solubilisierte ^3H -DHP markierte Rezeptor wurde in dem Überstand durch Polyethylenglycol (PEG) - Präzipitation (siehe 1.2.3.) untersucht.

1.1.2. Affinitätschromatographie (WGA-Sepharose I)

Puffer-G: 10 mM HEPES/Tris, pH 7.4
185 mM KCl
1 mM CaCl_2
1 μM Pepstatin A
1 mM PMSF

Puffer-H: 10 mM HEPES/Tris, pH 7.4
185 mM KCl
1 mM CaCl_2
0,1 % Digitonin
1 μM Pepstatin A
1 mM PMSF

Puffer-K: 10 mM HEPES/Tris, pH 7.4
185 mM KCl
1 mM CaCl_2
0,1 % Digitonin
100 mM NAGA
1 μM Pepstatin A
1 mM PMSF

Der solubilisierter³H-DHP-Rezeptorkomplex wurde 1 : 1 (v/v) mit Puffer-G, in dem sich die Affinitätsmatrix (WGA-Sepharose, 350µl Matrix / mg solubilisierter Protein) befindet, verdünnt. WGA ist ein Pflanzenlectin, das N-Acetylglucosamin-Reste bindet und dadurch zur spezifischen Präzipitation von entsprechenden Glycoproteinen eingesetzt werden kann. Die WGA-Matrix wurde 30 Min. mit der Protein-Lösung äquilibriert, in eine Säule gegeben (Tab.III) und mit Puffer-H gewaschen. Das Säuleneluat wurde fraktioniert gesammelt und von jeder Fraktion wurde die Radioaktivität bestimmt. Nachdem die WGA-Säule von nicht gebundenem ³H-DHP freigewaschen war, wurde der retardierte DHP-Rezeptor mit Puffer-K eluiert.

Tabelle III

Parameter der Säulenchromatographie für die Rezeptor-Isolierung

Säule	Dimension [cm]	Flußrate [ml/Min.]	Puffer
WGA-Sepharose I	1,9 x 2,5	1,1	H,K
DEAE-Sephadex	0,5 x 4,0	0,8	L
WGA-Sepharose II	1,0 x 1,3	1,1	H,N

Die Konzentration des Rezeptors in den einzelnen Fraktionen wurde durch Messung der Radioaktivität bestimmt und die rezeptorhaltigen Fraktionen wurden zusammengegeben.

1.1.3. Ionenaustauschchromatographie (DEAE-Sephadex A-25)

Puffer-L: 50 mM Tris/HCl, pH 7.4

20 mM NaCl

1 mM CaCl₂

0,1 % Digitonin

1 µM Pepstatin A

1 mM PMSF

Puffer-M: 50 mM Tris/HCl, pH 7.4

1 mM CaCl_2

0,1 % Digitonin

1 μM Pepstatin A

1 mM PMSF

Nach der WGA-Chromatographie wurde die angereicherte Rezeptorfraction mit H_2O auf die Leitfähigkeit des Puffer-L, mit dem die DEAE-Säule (Tab.III) äquilibriert war, verdünnt (1:1, v/v). Die Probe wurde auf die DEAE-Säule gegeben, mit Puffer-L gewaschen und mit einem linearen 50 ml-Gradienten von 20 mM auf 300 mM NaCl in Puffer-M eluiert. Die rezeptorhaltigen Fractionen wurden zusammengegeben.

1.1.4. Affinitätschromatographie (WGA-Sepharose II)

Puffer-N: 10 mM HEPES/Tris, pH 7.4

185 mM KCl

1 mM CaCl_2

0,1 % Digitonin

200 mM NAGA

1 μM Pepstatin A

1 mM PMSF

Das Eluat der DEAE-Sephadex-Säule wurde zur Konzentrierung und weiteren Aufreinigung des Rezeptors ein weiteres Mal über eine WGA-Säule (Tab. III) chromatographiert. Die Bedingungen entsprechen den unter 1.1.2. aufgeführten, mit der Ausnahme, daß mit Puffer-N eluiert wurde.

1.1.5. *Isolierung des DHP-Rezeptors*

In Bindungsexperimenten mit aufgereinigtem Rezeptor stören durch die Aufarbeitung mitgeschleppte Tritium-markierte Dihydropyridine. Deshalb wurde in diesen Fällen der Rezeptor ohne Vormarkierung mit ^3H -DHPs aufgereinigt. Das Aufarbeitungsschema entspricht im Prinzip der unter 1.1.1. bis 1.1.4. aufgeführten Isolierung, nur wurden die Membranproteine direkt in Puffer-F solubilisiert. Die in 1.1.1. beschriebene Markierung mit ^3H -Nitrendipin oder ^3H -PN 200-110 wurde nicht durchgeführt. In den folgenden Säuleneluatzen wurde die Rezeptorkonzentration in den einzelnen Fraktionen bestimmt, indem ein Aliquot aus jeder zweiten Fraktion mit ^3H -PN 200-110 nachmarkiert (1 - 2 nM, 90 Min. , 4°C) und rezeptorgebundener Ligand durch PEG-Präzipitation (1.2.3.) bestimmt wurde.

Die Nachmarkierung des solubilisierten Rezeptors war nur mit dem DHP PN 200-110 möglich.

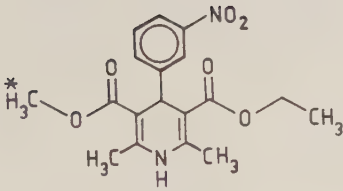
1.2.0. *Bindungstest*

1.2.1. *Calciumkanal Liganden*

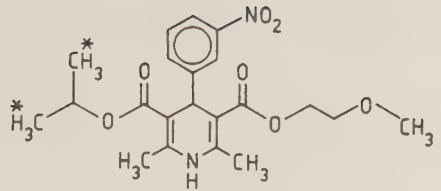
Die Tritium-markierten Dihydropyridine wurden in Ethanol bei -20°C unter Argon gelagert. Nicht markierte Liganden wurden in DMSO gelöst und bei -20°C unter Argon aufbewahrt. Um eine Photoaktivierung der lichtempfindlichen Dihydropyridine (Ehlert et al., 1982; Rosenberger und Triggle, 1977) zu vermeiden, erfolgte die Handhabung ausschließlich unter Gelb- bzw. Rotlicht.

Die radiochemische Reinheit der Liganden wurde regelmäßig durch Dünnschicht-chromatographie (DC) auf Polygram SIL G/UV254-Fertigfolien (Laufmittel; Chloroform : Aceton = 9 : 1) und anschließender Fluorographie (siehe 1.5.6.) der DC-Platte überprüft. Es wurden jeweils 0,4 μCi der markierten Substanz und 10nM der analogen nicht markierten Substanz (Referenzprobe) aufgetragen.

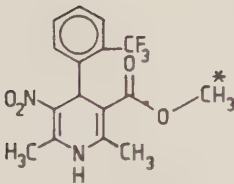
In Abb.3 sind die Strukturformeln der verwendeten Calciumkanal Liganden dargestellt.



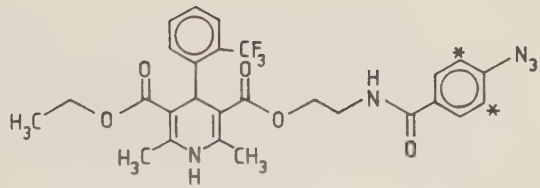
Nitrendipin



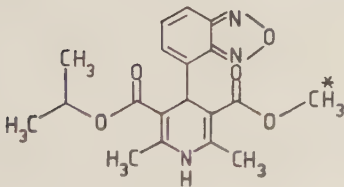
Nimodipin



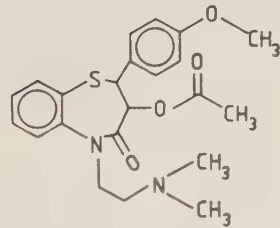
Bay K 8644



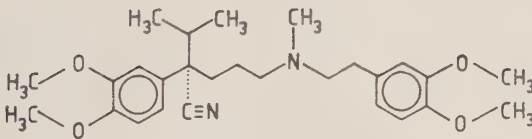
Azidopin



PN 200-110



Diltiazem



Verapamil

Abb. 3: Strukturformeln der verwendeten Calciumkanal-Liganden

Abb. 3 Strukturformeln der verwendeten Calciumkanal-Liganden. Es wurden Calciumkanal-Liganden verschiedener chemischer Substanzklassen verwendet. Zur Klasse der Dihydropyridine gehört der Calciumkanal-Agonist Bay K 8644 und die Calciumkanal-Antagonisten Nimodipin, Nitrendipin, PN 200-110 und Azidopin. Sie wurden auf Grund ihrer hohen Bindungsaffinität ($K_D = \text{nM}$) zur Aufreinigung und zur Charakterisierung des Rezeptors verwendet. In den Strukturformeln werden die radioaktiv markierten Positionen durch ein Sternchen angezeigt. Zur Charakterisierung der DHP-Bindung an den Rezeptor wurden die Calciumkanal-Antagonisten Diltiazem (ein Benzothiazepin) und Verapamil (ein Diphenylalkylamin) eingesetzt.

1.2.2. Markierung des membrangebundenen Rezeptors

Puffer-C: 10 mM HEPES/Tris, pH 7.4

185 mM KCl

1 mM CaCl_2

1 μM Pepstatin A

1 mM PMSF

Puffer-D: 50 mM Tris/HCl, pH 7.4

1 μM Pepstatin A

1 mM PMSF

Die Membranen wurden mit Puffer-C oder Puffer-D bis zu einer Konzentration von 0,01 - 1 mg Protein/ml Lösung verdünnt. Zu jeweils 1 ml Membransuspension wurde die entsprechende Menge an ^3H -DHP [0,1 - 10nM] gegeben (totale Bindung). Eine Hälfte der Probe ($V=0,5\text{ml}$) wurde zusätzlich mit einem Überschuß an nicht markiertem DHP ([DHP] = 1 μM) versehen (Kompetition). Nach einer Inkubationszeit von 90 Min. bei 4°C (oder 120 Min. bei 37°C) wurden je $2 \times 200 \mu\text{l}$ Membransuspension mit eiskaltem Puffer-D 10fach verdünnt und sofort über Glasfaserfilter (Schleicher & Schüll) filtriert. Die Filter wurden noch zweimal mit

je 3 ml eiskaltem Puffer-D gewaschen, für 10 Min. bei 100°C getrocknet und mit PPO/Toluol extrahiert (siehe 1.5.3.). Die Differenz aus der gemessenen totalen Bindung und der unspezifischen Bindung (Kompetition) wird als spezifische Bindung bezeichnet.

1.2.3. *Messung des Digitonin-solubilisierten ³H-DHP-Rezeptorkomplexes*

Die Bindung von Dihydropyridinen an den Digitonin-solubilisierten Rezeptor (siehe 1.1.1.) wurde gemessen, indem der ³H-DHP-Rezeptorkomplex unter milden, nicht denaturierenden Bedingungen gefällt wurde (Curtis & Catterall, 1983). Dadurch wurde vermieden, daß der nur reversibel gebundene Ligand während der Präzipitation abdissoziiert. Dazu wurden 0.1 µg - 25 µg des markierten, solubilisierten Proteins mit 0.5 mg γ-Globulin als Trägerprotein versetzt, mit Puffer-D auf 300 µl aufgefüllt und schließlich durch Zugabe von 150 µl 30% (w/v) PEG (MG: 6000-7500) gefällt. Nach 5 - 30 Minuten wurde das Präzipitat auf Glasfaserfiltern gesammelt, zweimal mit je 3 ml 8.5% (w/v) PEG in Puffer-D gewaschen, getrocknet und gezählt.

1.2.4. *Analytik des DHP-Rezeptors*

Aus der Menge des rezeptorgebundenen Liganden in Abhängigkeit von der freien (nicht rezeptorgebundenen) Konzentration des Liganden kann die Gleichgewichtskonstante (K_D) und die Zahl der Bindungsstellen (B_{max}) bestimmt werden (Scatchard, 1949).

$$B/F = - 1/K_D * (n - B)$$

B rezeptorgebundener Ligand

F freier Ligand

n Zahl der Bindungsstellen

K_D Gleichgewichtskonstante

Eine Auftragung von B/F gegen B resultiert in einer Geraden, aus deren Steigung ($m = -1/K_D$) die Bindungskonstante bestimmt werden kann. Der Abschnitt auf der Abszisse gibt die Anzahl der Bindungsstellen wieder.

1.3.0. Photoaffinitätsmarkierung

Puffer-D: 50 mM Tris/HCl, pH 7.4
1 mM Pepstatin A
1 mM PMSF

Puffer-E: 50 mM Tris/HCl, pH 7.4
0,25 mg BSA/ml
1 μ M Pepstatin A
1 mM PMSF

Puffer-R: 30 mM Tris/HCl, pH 6.8
3 % SDS
10 % Glycerin
12 mM EDTA
20 mM DTT/NEMA
1 μ M Pepstatin A
1 mM PMSF

Puffer-S: 10 mM HEPES/Tris, pH 7.4
150 mM NaCl
1 μ M Pepstatin A
1 mM PMSF

1.3.1. T-Tubuli Membranen

Die Membranen wurden in Puffer-D suspendiert (0.25 mg Protein/ml) und mit 5 - 10 nM ^3H -Nimodipin oder ^3H -Azidopin für 90 Min. bei 4°C inkubiert. Die unspezifische Bindung (Kompetition) wurde in Parallelansätzen mit einem 100fachen Überschuß an nicht-markiertem Nimodipin oder Nitrendipin (1 μM) bestimmt. Die Membranen wurden pelletiert (SW 65, 65.000xg, 20 Min.), mit Puffer-E gewaschen und in Puffer-D resuspendiert.

^3H -Nimodipin-markierte Membranen wurden in einer Quarzküvette für 40 Sek. mit einer Quecksilberdampf-Hochdrucklampe (HBO 500 W/2, Osram) bei Wellenlängen > 320 nm (1 mm dickes Kantenfilter WG 320, Schott) bestrahlt (Gronemeyer & Pongs, 1980). Die Probe wurde während der Bestrahlung kontinuierlich gerührt und durch -40°C kalte Druckluft gekühlt, so daß die Temperatur nie über 10°C anstieg.

^3H -Azidopin-markierte Membranen wurden in einer Petri-Schale ($\varnothing$ 8 cm) auf Eis für 2 Min. in 10 cm Entfernung mit einer Schwarzlichtlampe (Sylvania F 36 W) bestrahlt (Ferry et al., 1984).

Nach der Photoaktivierung wurden die bestrahlten Membranen pelletiert und in SDS-Probenpuffer (Puffer-R) suspendiert.

Die Bestrahlungsausbeute wurde bestimmt, indem die bestrahlten, in Puffer-R gelösten Proben (totale Bindung/Kompetition) mit 10% TCA gefällt (4°C , 12 Std.) und über Glasfaserfilter filtriert wurden. Die Filter wurden zweimal mit 5% TCA und einmal mit 70% Ethanol gewaschen und getrocknet. Der kovalent gebundene ^3H -Ligand wurde mit PPO/Toluol gemessen. Die Differenz zwischen totaler Bindung und Competition (Überschuß an kaltem Liganden) ergibt die spezifische Bestrahlungsausbeute.

1.3.2. Angereicherter Rezeptor

T-Tubuli Membranen (1 mg Protein/ml) wurden mit 10 nM ^3H -Nimodipin oder 5 nM ^3H -Azidopin für 90 Min. bei 4°C inkubiert. Der markierte Rezeptor wurde, wie in Abschnitt 1.1. beschrieben, isoliert, mit der Ausnahme, daß die t-Tubuli Membranen mit Puffer-S auf 1 mg/ml verdünnt wurden. Das Eluat der ersten WGA-Säule wurde direkt bestrahlt (siehe 1.3.1.).

Nach der Photoaktivierung wurde der ^3H -Nimodipin-markierte Rezeptor lyophilisiert, mit H_2O benetzt und in Puffer-R gelöst.

Nach der Bestrahlung des ^3H -Azidopin-Rezeptorkomplexes wurde ein gleiches Volumen 2%iger SDS-Lösung zugegeben und über Nacht bei 20°C inkubiert. Diese Protein-Lösung wurde schließlich elektrokonzentriert (Biotrap, 200 V , 6 Std. , Schleicher & Schüll) und mit Puffer-R versetzt.

1.4.0. Limitierte Proteolyse

T-Tubuli Membranen wurden in Puffer-D suspendiert (0,4 mg Protein /ml) und mit ^3H -Azidopin für 90 Min. bei 4°C markiert. Ein Parallelansatz wurde zur Bestimmung der unspezifischen Bindung mit einem 100fachen Überschuß an nicht markiertem DHP-Liganden (PN 200-110) inkubiert. Zur Entfernung von nicht gebundenem (freiem) DHP-Liganden wurden die Membranen mit Puffer-D gewaschen. Sie wurden nicht pelletiert, sondern zur schonenderen Behandlung auf ein 40%iges (w/w) Sucrose-Kissen sedimentiert (SW40-Rotor, Beckman, 200.000xg, 40 Min.). Die sichtbare Membranbande wurde mit einer Pasteur-Pipette abgenommen, mit Puffer-E 5fach verdünnt und erneut auf ein 40%iges (w/w) Sucrose-Kissen sedimentiert. Diese Membranbande wurde schließlich mit Puffer-D 10fach verdünnt und in einer Petri-Schale (Ø 8 cm) in 10 cm Entfernung für 3 Min. mit einer Schwarzlichtlampe bestrahlt (siehe 1.3.1.). Die bestrahlten Membranen wurden von nicht abreagiertem ^3H -Azidopin durch Sedimentation auf ein 40%iges (w/w) Sucrose-Kissen getrennt. Die limitierte Proteolyse wurde mit $140\text{ }\mu\text{g}$ ^3H -Azidopin-markierten Membranproteinen im $60\text{ }\mu\text{l}$ Probenansatz mit $0,5 - 10\text{ }\mu\text{g}$ Protease (V_8 -Protease oder α -Chymotrypsin) durchgeführt. Die Proben wurden 60 Min. bei 4°C inkubiert. Dann wurden $5\text{ }\mu\text{l}$ einer Protease-Inhibitor-Lösung zugegeben ($1\text{ }\mu\text{M}$ Pepstatin A, 1 mM PMSF, $1\text{ }\mu\text{M}$ Aprotinin, $1\text{ }\mu\text{M}$ Antipain, 2 mM EDTA). Nach weiteren 10 Min. bei 4°C wurde die Verdauung mit 10% β -Mercaptoethanol und 6% SDS gestoppt. Die Proteolyseprodukte wurden auf einem SDS-PAA-Gel mit anschließender Fluorographie analysiert.

1.5.0. Sonstige Methoden

1.5.1. Puffer

Die Puffer wurden mit bidestilliertem H_2O angesetzt, filtriert (Nitrocellulose, $0,45\text{ }\mu\text{m}$) und entgast. Die Protease-Inhibitoren wurden jeweils frisch zugegeben. Digitonin-haltige Puffer wurden 5 Min. bei 100°C gekocht bis eine homogene Digitonin-Suspension entstanden war.

In Tab. IV sind die in dieser Arbeit verwendeten Puffer zusammengestellt.

Tabelle IVa

Zusammensetzung der verwendeten Puffer

Puffer	A	B	C	D	E	F	G	H	K	L	M
HEPES/Tris	-	-	10	-	-	10	10	10	10	-	-
Tris/HCl	-	-	-	50	50	-	-	-	50	50	-
Tris/Maleat	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KH_2PO_4	-	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sucrose	300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MgCl_2	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KCl	-	0,15	185	-	-	185	185	185	185	-	-
CaCl_2	-	0,3	1	-	-	-	1	1	1	1	1
NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20	-
ATP	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BSA (mg/ml)	-	-	-	-	0,25	-	-	-	-	-	-
Digitonin (% w/v)	-	-	-	-	-	1	-	0,1	0,1	0,1	0,1
NAGA	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-
Pepstatin A (μM)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
PMSF	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
pH	7.0	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4

Die Konzentrationsangaben sind, wenn nicht anders erwähnt, in mM.

Tabelle IVb

Zusammensetzung der verwendeten Puffer

Puffer	N	O	P	R	S	T	U	V	W	X
HEPES/Tris	10	-	-	-	10	10	-	-	-	-
Tris/HCl	-	-	-	30	-	-	50	50	50	50
Sucrose	-	250	250	-	-	-	-	-	-	-
KCl	185	-	-	-	-	185	185	185	185	185
CaCl ₂	1	-	-	-	-	-	1	1	0,1	-
NaCl	-	-	-	-	150	-	-	-	-	-
Histidin (%,w/v)	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-
SDS (%,w/v)	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-
Glycerin	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-
EDTA	-	0,2	-	12	-	-	-	-	-	-
Digitonin (%,w/v)	0,1	-	-	-	-	-	0,1	-	-	0,1
NAGA	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DTT/NEMA	-	-	-	20/20	-	-	-	-	-	-
Pepstatin A	1	-	-	-	1	1	1	1	1	1
PMSF	1	-	-	-	1	1	1	1	1	1
pH	7.4	7.4	7.4	6.8	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4

Die Konzentrationsangaben sind, wenn nicht anders erwähnt, in mM.

1.5.2. Proteinbestimmung

Proteinkonzentrationen wurden mit dem Farbstoff-Bindungs-Test nach Bradford (1976) bestimmt. Die Meßergebnisse wurden mit einer BSA- Lösung geeicht, deren Proteinkonzentration über Aminosäureanalyse überprüft worden war.

1.5.3. Messung der Radioaktivität

Glasfaserfilter wurden nach dem Trocknen (10 Min., 100°C) in 10 ml PPO / Toluol (0,4g / Liter) entweder in einem Beckman LS 9000 oder in einem Searle Delta 300 Flüssigszintillationszähler gezählt.

Radioaktive wässrige Proben wurden in Quickszint 2000 gelöst und gezählt.

1.5.4. Zonenzentrifugation

Die Sedimentationskonstante des DHP-Rezeptors wurde auf isokinetischen 5 – 20%igen Sucrosegradienten bestimmt (Noll, 1967). Zur Standardisierung wurden identische Gradienten mit Thyroglobulin (19,2 S_{20,w}) und γ -Globulin (7 S_{20,w}) parallel zentrifugiert. Auf jeden Gradienten wurden 250 μ l in Puffer-F solubilisierter ³H-DHP-Rezeptorkomplex aufgetragen (16 ml Gradient, TV 865 B, Sorvall, 236.000 xg, 80 Min.). Die Gradienten wurden fraktioniert und die Absorption wurde im Durchflußphotometer (Gilford Instruments 250) bei 280 nm bestimmt. Die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen wurde durch Messung von Aliquots bestimmt.

1.5.5. SDS-Polyacrylamid - Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese von Proteinen wurde unter denaturierenden Bedingungen nach der Methode von Laemmli (1970) durchgeführt. Es wurden SDS-Polyacrylamid (PAA)-Gele mit 8,75 % Acrylamid und 0,23 % Bisacrylamid verwendet. Die Gele wurden mit RNA-Polymerase, IF 2 und Thyroglobulin standardisiert (Tab. V).

Tabelle V

Proteine für die Standardisierung der SDS-PAA-Gelelektrophorese

PROTEIN	MOLEKULARGEWICHT
RNA-Polymerase (E.coli)	
β -Untereinheit	165.000
β' -Untereinheit	155.000
σ -Untereinheit	90.000
α -Untereinheit	39.000
Initiationsfaktor IF2	118.000
Thyroglobulin	330.000

Die Proteine wurden mit 0,07 % (w/v) Serva Blau R 250 angefärbt. Bei geringen Proteinmengen wurde das bereits gefärbte Gel in 10 - 40%iger PEG-Lösung geschrumpft (Palumbo & Tecce, 1983), wobei eine bis zu 4fache Verstärkung der Proteinbanden erreicht wurde.

Bei sehr geringen Proteinmengen (< 100 ng / Bande) wurde die empfindliche Silberfärbung nach der Methode von Merrill et al. (1981) oder die Doppelfärbung nach der Methode von Dzandu et al. (1984) angewandt, wobei in beiden Fällen während der AgNO_3 -Inkubation zusätzlich mit UV-Licht sensibilisiert wurde.

Die Gel-Proben wurden 24 Std. bei 25°C mit Puffer-R inkubiert, 2 Min. auf 95°C erhitzt und vor der Auftragung wieder auf 25°C abgekühlt.

1.5.6. Fluorographie

SDS-PAA-Gele wurden nach der Anfärbung entweder nach Laskey (1980) fluorographiert oder mit ^3H -Enhancer (NEN) nach Herstellerangaben imprägniert. Dünnschichtplatten wurden mit ^3H -Enhancer (EN³HANCETM Spray, NEN) angesprüht. Die Röntgenfilme (Fuji, Amersham) wurden mit einem Elektronenblitz auf 0,15 A₅₅₀ vorbelichtet.

Ergebnisse

2.0.0. Membranpräparationen

Der DHP-Rezeptor wurde aus Kaninchen-Skelettmuskel isoliert. Der kritische Schritt bei der Isolierung von Membranproteinen ist die Präparation einer Membranfraktion, aus der sich das Protein ohne Degradation herauslösen (solubilisieren) läßt, um anschließend über diverse Säulenchromatographien o. ä. angereichert zu werden. Während der Membranpräparation mitgeschleppte membrangebundene oder lysosomale Proteasen werden durch die Solubilisierung freigesetzt (aktiviert) und können zu erheblichen Verlusten führen. Deshalb wurden in dieser Arbeit drei verschiedene, zum Teil sehr aufwendige Methoden untersucht, aus Kaninchen-Skelettmuskel intakte Membranen zu isolieren. Die im experimentellen Teil nicht näher beschriebene Methode zur Isolierung von Muskelmikrosomen nach De Meis und Hasselbach (1971) wurde trotz der guten Proteinausbeuten und der erwarteten DHP-Bindungskapazität (Tabelle VI) des membrangebundenen Rezeptors nicht angewandt. Nach dieser relativ einfachen und schnellen Mikrosomenpräparation werden Membranen isoliert, aus denen das Rezeptorprotein nur in degradierter Form

Tabelle VI

Vergleich der angewandten Membranpräparationen

Methode	Muskelfleisch [g]	Protein [mg]	Rezeptor [pmol/mg]	Digitonin solubilisierter Rezeptor [pmol/mg]
De Meis & Hasselbach (1971)	700	28	2,0	0,2
Calciumphosphat (siehe 1.0.1.)	300	5,2	2,0	1,9
Ribi-Pressae (siehe 1.0.2.)	200	20	2,0	1,9

solubilisiert werden kann. Die DHP-Bindungsaktivität geht nach Solubilisierung in Digitonin auf 10% zurück (Tabelle VI). Auch der verbleibende, aktive Rezeptor ließ sich nicht über WGA-Sepharose, den wichtigsten Isolierungsschritt, anreichern, weil in dieser Membranprotein-Mischung vermutlich zu viele Glycoproteine mit WGA-Bindungsaffinität vorhanden sind.

Deshalb wurden zwei alternative, relativ aufwendige Verfahren zur Isolierung von reinen t-Tubuli Membranen aus Skelettmuskel angewandt. Die DHP-Bindung an Membranvesikel wurde dabei als spezifischer Marker für t-Tubuli Membranen eingesetzt (Fosset et al., 1983). Nach der Calciumphosphat-Methode (siehe 1.0.1.) wurden t-Tubuli Membranen aus Muskelmikrosomen präpariert, indem zuerst Oberflächenmembranen (OM) angereichert wurden. Kontaminierende Vesikel von sarkoplasmatischem Ursprung wurden nach Akkumulation von Calciumphosphat in Gegenwart von ATP (Roseblatt et al., 1981) auf einem diskontinuierlichen Sucrose-Dichtegradienten abgetrennt (Abb. 2). In Tabelle VII sind die verschiedenen Membranfraktionen mit ihrem Rezeptorgehalt gezeigt. Es war nicht möglich, t-Tubuli

Tabelle VII

Proteinverteilung und Rezeptorkonzentration in den verschiedenen Membranfraktionen der Calciumphosphat-Methode

FRAKTION	<u>OM</u>	<u>l-SR</u>	<u>m-SR</u>	<u>s-SR</u>	<u>TT</u>	<u>SR-1</u>	<u>SR-2</u>	<u>P</u>
Protein [mg]	5,4	23,5	33,6	18,2	1,1	1,4	0,1	0,01
Rezeptor [pmol/mg]	1,8	1,8	1,0	0,6	2,1	1,5	0,5	0,1

Während der Membranisolierung wurden von den verschiedenen Fraktionen Aliquots entnommen, in Puffer-G verdünnt (120 µg Protein/ml), mit 1,1 nM ³H-Nimodipin für 90 Min. bei 4 °C inkubiert und filtriert.

Membranen auf dem Sucrose-Dichtegradienten in einer Bande zu konzentrieren. Sie wurden über sämtliche SR-Fraktionen vermutlich in der sogenannten Triaden-Struktur (komplexiert mit terminalen Cisternen) gefunden. Die Beladung mit Calciumphosphat führt zu keiner vollständigen Trennung der Triaden in t-Tubuli und terminale-

Cisternen. Ein erheblicher Teil der t-Tubuli Membranen wurde auf dem zweiten Sucrose-Dichtegradienten auch in der SR-1, SR-2 und P-Fraktion gefunden.

Nach der alternativen Methode (siehe 1.0.2.) wurden die t-Tubuli Membranen aus einer Mikrosomenfraktion, die vorwiegend aus t-Tubuli und Triaden besteht, isoliert. Die Triaden-Struktur wird unter Druck (Ribi-Presse) aufgebrochen und die entstehenden Membranen (t-Tubuli, terminale Cisternen und Triaden) werden auf einem Sucrose-Dichtegradienten aufgetrennt (Lau et al., 1977). Die Membranen sollten dem geringst möglichen Druck ausgesetzt werden, weil ein unnötig hoher Druck die terminalen Cisternen fragmentieren könnte. Die Fragmentierungsprodukte könnten die t-Tubuli Membranen auf dem folgenden Sucrose-Dichtegradienten kontaminieren. Deshalb wurden Aliquots einer mikrosomalen Fraktion steigenden Drücken ausgesetzt und das Aufbrechen der Triaden wurde durch DHP-Bindung verfolgt. In Abb.4 sind die der Druckbehandlung folgenden Sucrosegradienten gezeigt. Bei geringem Druck (Abb. 4A) sind deutlich zwei Membranfraktionen mit DHP-Bindungsaktivität zu sehen. Die leichte Fraktion (~ 20% Sucrose) enthält t-Tubuli, wogegen die schwere Fraktion (~ 40% Sucrose) aus noch intakten Triaden besteht. Bei steigenden Drücken nimmt die schwere Fraktion (Abb. 4B und 4C) ab, bis bei einem Druck von 15.000 psi (Abb. 4C) die Triaden vollständig aufgebrochen sind,

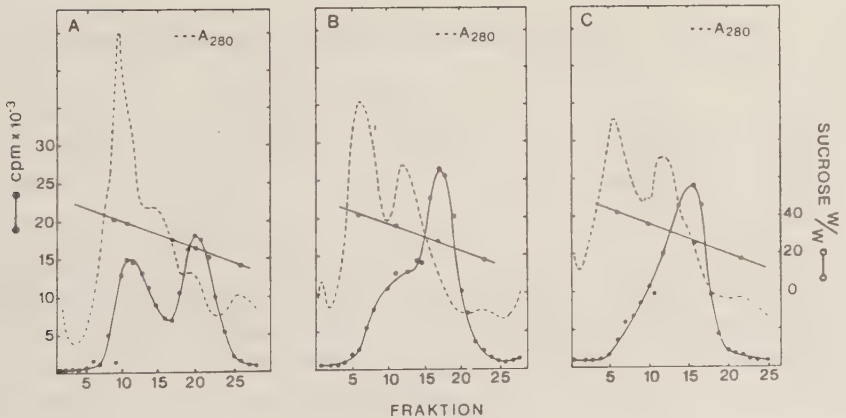


Abb. 4: Isolation von t-Tubuli Membranen nach der Ribī-Pressē-Methode.

Jeweils 5 mg Protein einer mikroaomalen Fraktion wurden auf der Ribī-Pressē verschiedenen Drücken ausgesetzt (A : 9000 psi; B : 12.000 psi; C : 15.000 psi). Das Aufbrechen der Triaden-Struktur in t-Tubuli Vesikel und SR-Membranen wurde über Sucrose-Dichtegradienten Zentrifugation (15 – 50 %, w/w, Sucrose in 2 mM L-Histidin (0–0), 141.000xg, 5 Std.) verfolgt. Aliquots der einzelnen Fraktionen des Sucrosegradienten wurden mit 0,5 nM H-PN 200-110 auf DHP-Bindung (●—●) untersucht.

so daß nur noch eine Fraktion mit DHP-Bindungsaktivität bei ~ 20% Sucrose übrig bleibt. Mit dieser Methode wurde eine Ausbeute von 20 mg t-Tubuli aus 200g Muskelfleisch (Tabelle VI) erhalten. Bei der Calciumphosphat-Methode konnten die t-Tubuli Membranen nicht in einer einzigen Bande konzentriert werden, worauf die um den Faktor 6 geringere Ausbeute relativ zu der Ribī-Pressē-Methode zurückzuführen ist (5,2 mg t-Tubuli aus 300g Muskelfleisch). Aus beiden Membranpräparationen konnte der DHP-Rezeptor ohne Aktivitätsverlust solubilisiert werden (Tabelle VI). Dazu waren bei der Calciumphosphat-Methode die Proteaseinhibitoren in sämtlichen Puffern essentiell. Ohne Inhibitoren wurden Membranen isoliert, aus denen der Rezeptor nicht ohne Verlust der DHP-Bindungsaktivität solubilisiert werden konnte. Im Gegensatz dazu waren bei der Ribī-Pressē-Methode Proteaseinhibitoren nicht notwendig. Die Methode zur Entfernung von proteasehaltigen Blutzellen (Infusion von Ringer-Lösung vor der Gewebeentnahme) ist so effektiv, daß bei der Homogenisierung

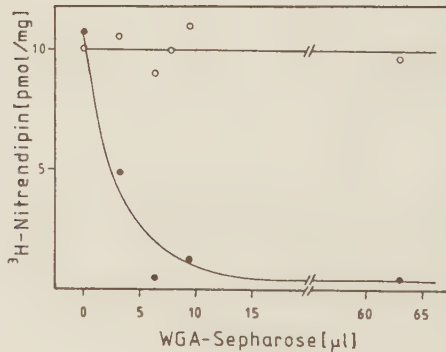


Abb. 5: Bestimmung der Membranorientierung. T-Tubuli Membranen (50 µg/ml Puffer-V), die nach der Calciumphosphat-Methode (• - •) oder nach der Ribī-Presse-Methode (○ - ○) isoliert wurden, wurden in einem Gesamtvolumen von 0,5 ml mit steigenden Mengen an WGA-Matrix (0 - 63 µl Matrix) inkubiert (1 Std., 4°C). Die WGA-Matrix wurde sedimentiert und Aliquots aus dem Überstand wurden für 90 Min. bei 4°C mit 5 nM ³H-Nitrendipin markiert. Parallelansätze wurden mit 1 µM Nitrendipin kompetiert. Die spezifische Bindung wurde wie in 1.2.2. bestimmt.

des Muskelgewebes kaum degradierende Enzyme freigesetzt werden. Da die Ausbeute nach der Ribī-Presse-Methode am besten war, wurden die meisten Experimente mit dieser t-Tubuli Membran durchgeführt.

In Abb. 5 ist die Orientierung der t-Tubuli Vesikel gezeigt. Der Test beruht auf der NAGA-Bindung der WGA-Sephärose (siehe 2.4.0.). Da die Proteine nur auf der extrazellulären Seite glycosyliert sind (Hirano et al., 1972), können nur Vesikel mit einer "normalen" Orientierung binden. Nach der Calciumphosphat-Methode werden demnach Vesikel mit einer "normalen" (natürlichen) Orientierung erhalten, d.h. die extrazelluläre Seite ist nach außen gerichtet (outside-out). Nach der Ribī-Presse-Methode erhält man Vesikel mit genau umgekehrter Orientierung. Hier ist die cytoplasmatische Seite der Membran nach außen gerichtet (inside-out).

2.1.0. Charakterisierung der Ligand-Rezeptor Wechselwirkung

Der DHP-Rezeptor bindet Dihydropyridine (DHP) mit hoher Affinität (Fosset et al., 1983 ; Ferry et al., 1984 ; Bellemann et al., 1981). Die Sättigung des membran-gebundenen Rezeptorproteins mit den zur Isolierung und Charakterisierung verwendeten Liganden (Nitrendipin, Azidopin und PN 200-110) ist in Abb. 6 dargestellt. Die unspezifische Bindung beträgt 20%-40% der totalen Bindung. Alle drei Liganden binden wie erwartet mit hoher Affinität an den Rezeptor. Die Auswertung der Daten nach Scatchard (1949) ergibt Gleichgewichtskonstanten von 0,9 nM für PN 200-110, 0,32 nM für Azidopin und 8,1 nM für Nitrendipin (Abb. 6A-6C, III). Da es nicht

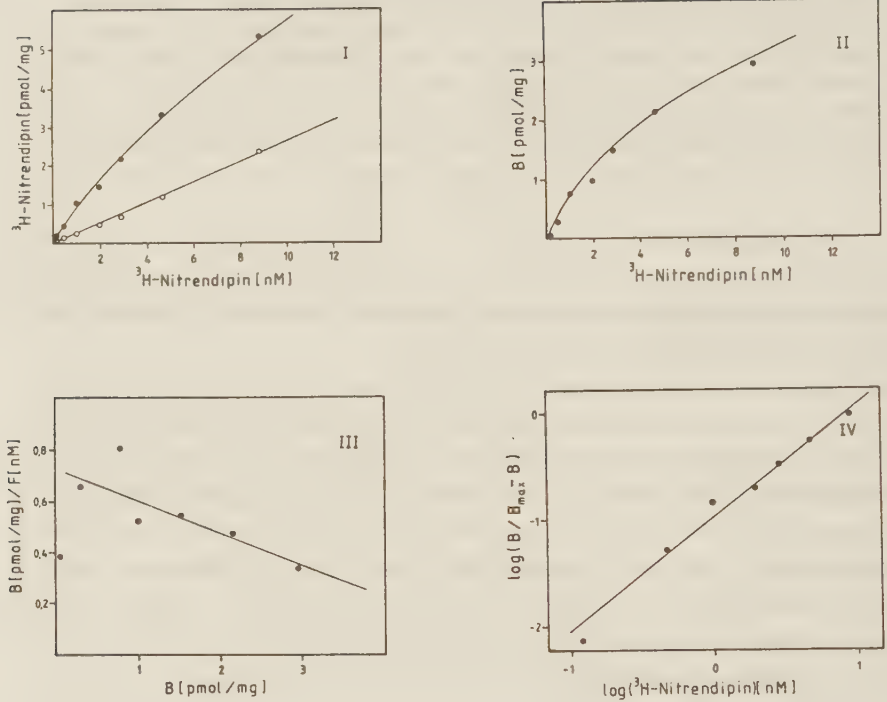


Abb. 6A: Bindung von $^3\text{H-Nitrendipin}$ an t-Tubuli Membranen. Die t-Tubuli Membranen (67 $\mu\text{g/ml}$ Puffer-T) wurden 90 Min. bei 4°C mit 0,1nM – 9,0nM $^3\text{H-Nitrendipin}$ inkubiert. In Parallelansätzen wurde mit 1 μM Nitrendipin kompetiert. Freies, nicht gebundenes $^3\text{H-Nitrendipin}$ wurde durch Filtration entfernt (siehe 1.2.2.).

I Bindungskurve

(●—●) totale Bindung

(○—○) unspezifische Bindung

II Bindungskurve

(●—●) spezifische Bindung

III Auftragung der Daten nach SCATCHARD

IV Auftragung der Daten nach HILL

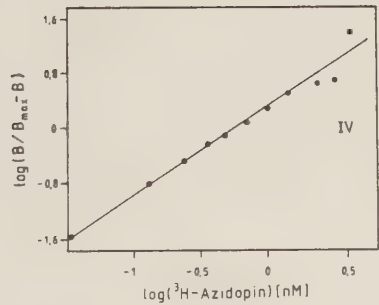
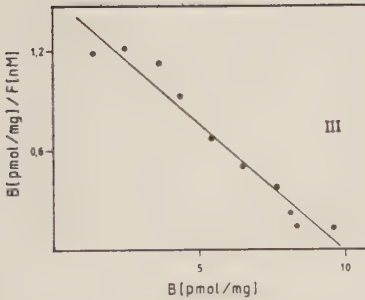
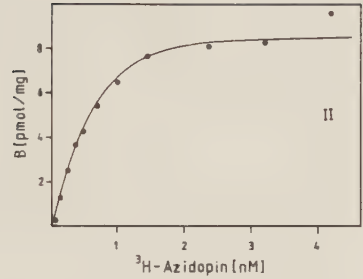
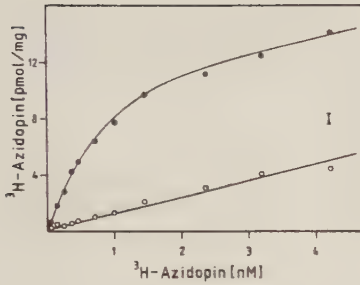


Abb. 6B: Bindung von ^3H -Azidopin an t-Tubuli Membranen. Die t-Tubuli Membranen (52 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Puffer-T) wurden 90 Min. bei 4°C mit 0,03nM – 4,0nM ^3H -Azidopin inkubiert. In Parallelansätzen wurde mit 1 μM Nitrendipin kompetiert. Freies, nicht gebundenes ^3H -Azidopin wurde durch Filtration entfernt (siehe 1.2.2.).

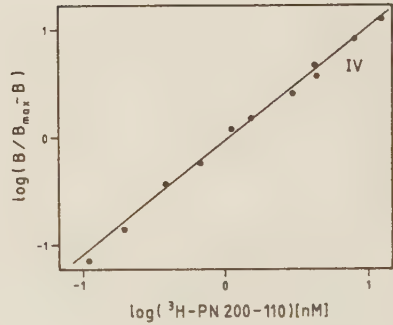
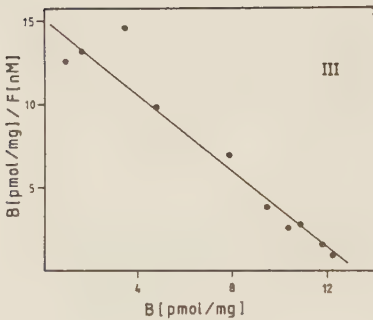
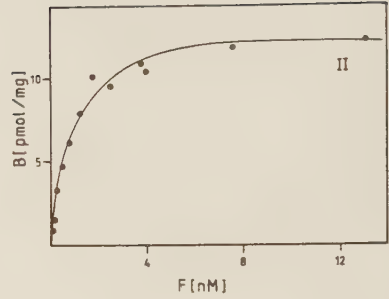
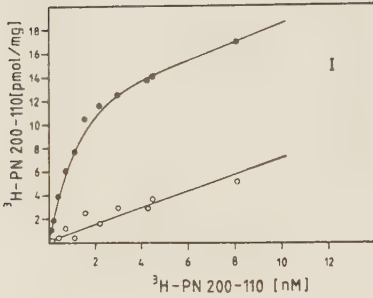


Abb. 6C: Bindung von ^3H -PN 200-110 an t-Tubuli Membranen. Die t-Tubuli Membranen (47 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Puffer-T) wurden 90 Min. bei 4°C mit 0,1nM – 14nM ^3H -PN 200-110 inkubiert. In Parallelansätzen wurde mit 1 μM PN 200-110 kompetiert. Freies, nicht gebundenes ^3H -PN 200-110 wurde durch Filtration entfernt (siehe 1.2.2.).

möglich ist, den Rezeptor vollständig mit Ligand abzusättigen, kann die maximale Zahl der Bindungsstellen ($B_{\max}$) nur durch Extrapolation abgeschätzt werden (Abb. 6A-6C, III). Die Rezeptorkonzentration schwankt zwischen 6 und 13 pmol/mg Protein. In Abb. 6A-6C, IV sind die Daten nach Hill (1910) aufgetragen und zeigen wie erwartet (Gould et al., 1984), daß die DHP-Bindung an den Rezeptor nicht kooperativ verläuft (Hill-Koeffizienten : $n = 0,94$ für Nitrendipin, $n = 0,77$ für Azidopin und $n = 1,1$ für PN 200-110).

Die Bindung von DHP-Liganden an den Rezeptor wird allosterisch durch Calciumkanal-Antagonisten beeinflusst (Murphy et al., 1983). In Abb. 7 ist die allosterische Regulation der DHP-Bindung an den Rezeptor durch die Calciumkanal-Antagonisten Diltiazem und Verapamil dargestellt. Steigende Konzentrationen an Verapamil inhibieren die PN 200-110-Bindung bei 4°C und bei 37°C. Die allosterische Stimulation durch Diltiazem ist nur bei 37°C möglich (Abb. 7B). Bei 4°C führt Diltiazem zu einer Inhibierung der PN 200-110-Bindung. Die allosterischen Effekte bei 37°C (Stimulierung durch Diltiazem und Inhibierung durch Verapamil) lassen sich durch eine Änderung der Dissoziationskinetiken erklären. In Abb. 8 ist die Dissoziation von PN 200-110 bei 37°C gezeigt. Die biphasischen Dissoziationskinetiken von PN 200-110 ($k_{-1} = 0,35 \pm 0,05$ [90% des rezeptorgebundenen Liganden]; $k_{-2} = 0,13 \pm 0,03$ [10% des rezeptorgebundenen Liganden]) werden durch Diltiazem verlangsamt ($k_{-1,DTZ} = 0,09 \pm 0,01$; $k_{-2,DTZ} = 0,05 \pm 0,01$) und durch Verapamil beschleunigt ($k_{-1,Vera} = 0,68 \pm 0,05$; $k_{-2,Vera} = 0,24 \pm 0,03$). Die Stimulierung durch Diltiazem bzw. die Inhibierung durch Verapamil beruhen also auf einer langsameren bzw. schnelleren Dissoziation des rezeptorgebundenen DHP-Liganden.

2.2.0 Solubilisierung mit Digitonin

Die erste und zugleich kritischste Stufe zur Isolierung des DHP-Rezeptors ist die Solubilisierung der t-Tubuli Membranen mit dem Detergenz Digitonin. Ein bereits degradierter Rezeptor könnte in der Membran durch Lipid-Stabilisierung noch die erwartete Reaktion zeigen, aber nach der Solubilisierung entfällt dieser evtl. vorhandene Stabilisierungseffekt und die Testreaktionen (z.B. Bindungsstudien) zeigen stark veränderte Werte. Deshalb wurde die Stabilität der DHP-Bindung (PN 200-110) im Digitonin-Extrakt gemessen (Abb. 9 A) und konnte mit der Dissoziationskinetik des Rezeptors (Abb. 9 B) korreliert werden. Die in den t-Tubuli

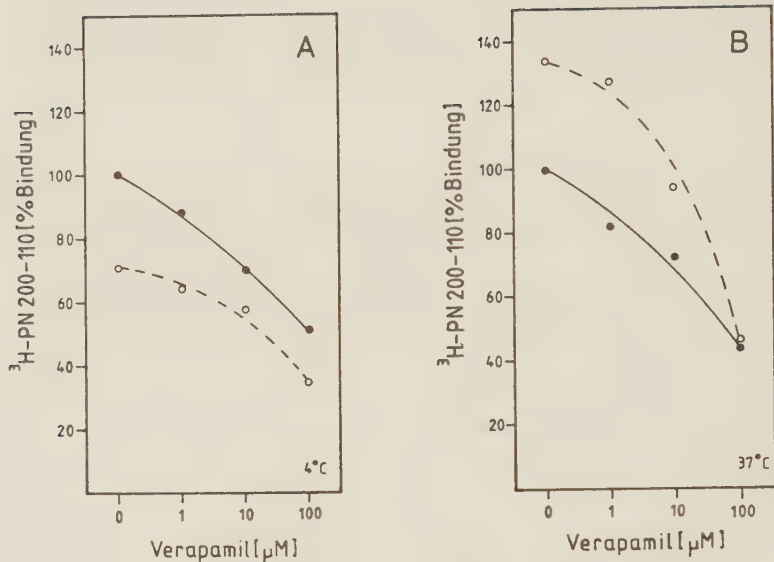


Abb. 7: Allosterische Regulation der PN 200-110-Bindung. **A:** T-Tubuli Membranen (50 $\mu\text{g/ml}$ Puffer-G) wurden mit 0,8 nM $^3\text{H-PN 200-110}$ (●) oder mit 0,8 nM $^3\text{H-PN 200-110}$ und 10 μM Diltiazem (○) für 90 Min. bei 4°C mit den angezeigten Konzentrationen von Verapamil inkubiert. **B:** T-Tubuli Membranen (50 $\mu\text{g/ml}$) wurden in 1 mM CaCl_2 /50 mM Tris/HCl, pH 7,4, mit 2,1 nM $^3\text{H-PN 200-110}$ (●) oder mit 2,1 nM $^3\text{H-PN 200-110}$ und zusätzlich 10 μM Diltiazem (○) bei 37°C für 2 Std. mit den angezeigten Konzentrationen von Verapamil inkubiert. Die Bindung wurde gemessen, wie beschrieben (siehe 1.2.2.).

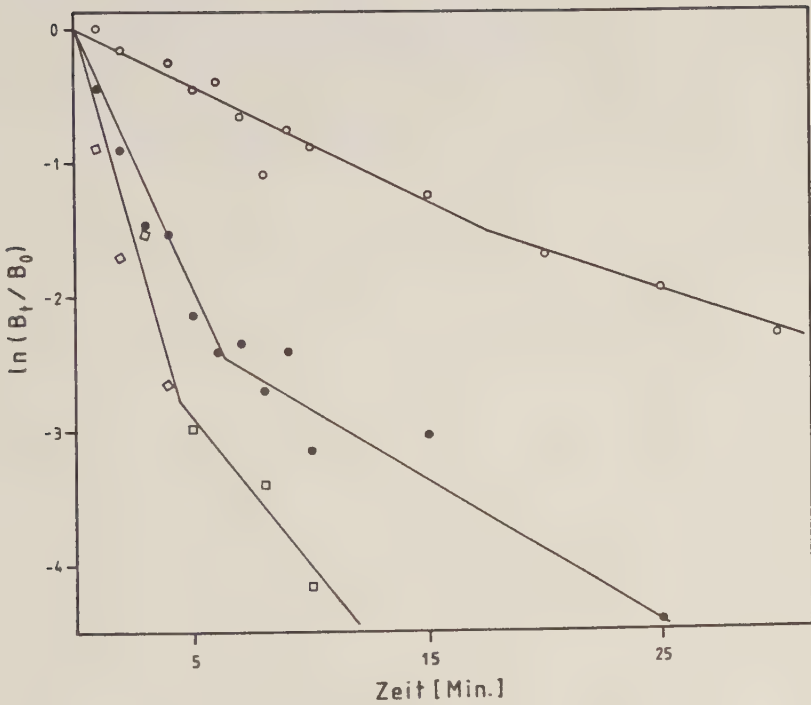


Abb. 8: Allosterische Regulation der Dissoziationskinetik. T-Tubuli Membranen (180 $\mu\text{g/ml}$) wurden in Puffer-D mit 0,8 nM ^3H -PN 200-110 ($\circ$), mit 0,8 nM ^3H -PN 200-110 und 100 μM Diltiazem ($\diamond$) oder mit 0,8 nM ^3H -PN 200-110 und 100 μM Verapamil ($\square$) für 2 Std. bei 37°C inkubiert. Die Dissoziation wurde durch Zugabe von nicht markiertem PN 200-110 (Endkonzentration 1 μM) initiiert. Aliquots wurden in 60 Sek. Intervallen entnommen und filtriert (siehe 1.2.2.).

Membranen beobachtete biphasische Dissoziation von PN 200-110 (Abb. 8) wurde nur in solchen Digitonin-Extrakten beobachtet, deren DHP-Bindungsaktivität über den gemessenen Zeitraum konstant blieb. In Digitonin-Extrakten einer instabilen Rezeptorpräparation nahm die DHP-Bindungsaktivität stark ab ($t_{1/2} = 24$ Std.) und gleichzeitig war nur noch die schnelle Dissoziationskinetik zu beobachten (Abb. 9). Dieses veränderte Bindungsverhalten zeigten Digitonin-Extrakte von t-Tubuli Membranen, die älter als 4 Monate und mehrfach aufgetaut waren.

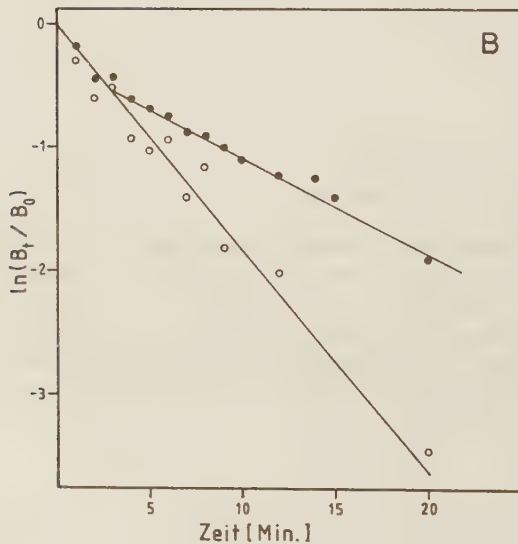


Abb. 9: Stabilität des in Digitonin solubilisierten Rezeptors. Es wurde die Dissoziationskinetik von zwei Digitonin-Extrakten unterschiedlicher Stabilität untersucht (Digitonin-Extrakt 1: (●) ; Digitonin-Extrakt 2 : (○)). (A) Die Stabilität wurde bestimmt, indem die Digitonin-Extrakte (100 µg Protein/ml Puffer-U) bei 4°C inkubiert wurden. Zu verschiedenen Zeiten wurde die Bindung bestimmt, indem Aliquots mit 5 nM ³H-PN 200-110 markiert, 90 Min. bei 4°C inkubiert und filtriert wurden. Parallelansätze wurden mit 1 µM PN 200-110 kompetiert. Die angegebenen Zeiten beziehen sich auf den Zeitpunkt der Filtration. (B) Die Digitonin-Extrakte (134 µg Protein/ml Puffer-M) wurden mit 7,5 nM ³H-PN 200-110 und 100 µM Diltiazem für 2 Std. bei 37°C inkubiert. Die Dissoziation wurde durch Zugabe von 1 µM PN 200-110 initiiert und zu den angegebenen Zeiten wurden Aliquots mit PEG gefällt.

2.3.0. Zonenzentrifugation

Die Zonenzentrifugation erlaubt die Größe eines Proteinmoleküls zu bestimmen (Noll, 1968). Im Gegensatz zu wasserlöslichen Proteinen, deren Größe im Vergleich zu Standardproteinen direkt abgeschätzt werden kann, können Membranproteine nur in Form ihres Protein/Detergenz-Komplexes untersucht werden. Die Bestimmung der Sedimentationskonstanten bezieht sich auf den Protein/Detergenz-Komplex und ändert sich mit dem verwendeten Detergenz (Tanford & Reynolds, 1976). Die Sedimentationskonstante des DHP-Rezeptor/Digitonin-Komplexes wurde auf einem linearen 5 – 20%igen Sucrose-Dichtegradienten bestimmt (Abb. 10). Die Sedimentation der Proteine wurde durch die Absorption bei 280 nm. die des Rezeptors durch Messung der Radioaktivität ermittelt. Der solubilisierter (1% Digitonin) DHP-Rezeptor sedimentiert bei 21 S_{20,w} und ist mit den publizierten Werten für den Rezeptor aus Kaninchen-Skelettmuskel (Curtis & Catterall, 1984), aus Rattenhirn (Curtis & Catterall, 1983) und aus Hühner-Herzmuskel (Rengasamy et al., 1985) vergleichbar.

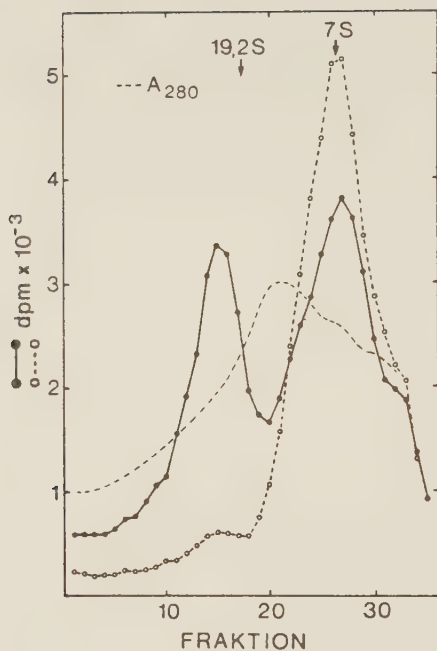


Abb. 10: Bestimmung der Sedimentationskonstanten. T-Tubuli Membranen (1 mg/ml Puffer-G) wurden für 90 Min. bei 4°C mit 10 nM ³H-Nimodipin (●) inkubiert. Ein Parallelansatz wurde mit 1 µM Nimodipin (○) kompetiert. Die Membranen wurden pelletiert (65.000 x g, 20 Min.), gewaschen und mit 1 % Digitonin (Puffer-F) solubilisiert. Auf einen linearen 5 – 20 %igen Sucrosegradienten wurden je 250 µg solubilisiertes Protein aufgetragen und für 80 Min. bei 236.000 x g zentrifugiert. Der Gradient wurde fraktioniert und Aliquots der einzelnen Fraktionen wurden gezählt.

2.4.0. Affinitätschromatographie

Zur Isolierung des DHP-Rezeptors wird als Affinitätschromatographie eine Lectin-Säule (WGA-Sephrose) eingesetzt (siehe 1.1.2.). Das Lectin Weizenkeim-Agglutinin (WGA) bindet mit hoher Affinität N-Acetylglucosamin-Reste (Gallagher et al., 1985) und kann zur Isolierung von Glycoproteinen verwendet werden. Der DHP-Rezeptor ist ein Glycoprotein und bindet an WGA-Sephrose (Curtis & Catterall, 1984). Um bei der WGA-Sephrose Affinitätschromatographie eine maximale Anreicherung des DHP-Rezeptors zu erreichen, wurde der Rezeptor im Überschuß zur WGA-Bindungskapazität eingesetzt. Dadurch wird die unspezifische Bindung von kontaminierenden Proteinen an die Matrix minimiert. In Abb. 11 ist die Titration der Matrix gezeigt. Der Pfeil gibt das zur Isolierung gewählte Verhältnis des Rezeptors zur Matrix an.

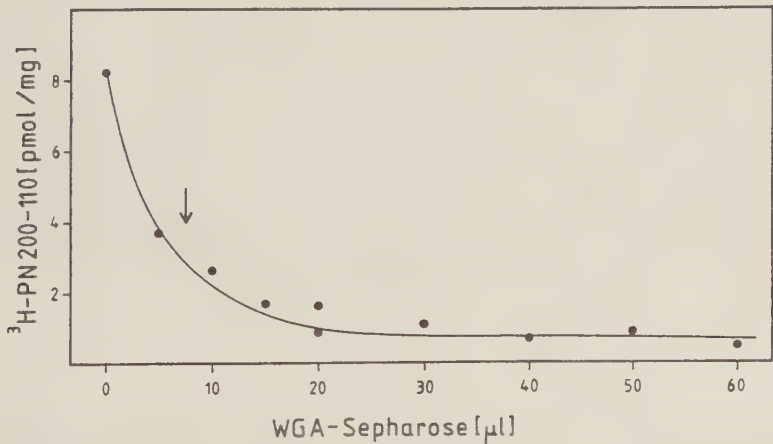


Abb. 11: Titration der WGA-Matrix. Solubilisierete t-Tubuli Membranen (57 µg/ml Puffer-V) wurden mit 8 nM ³H-PN 200-110 für 90 Min. bei 4°C inkubiert. Ein Parallelansatz wurde mit 1 µM PN 200-110 kompetiert. Steigende Mengen WGA-Matrix wurden mit jeweils 20 µg des solubilisierten und markierten Proteins für 30 Min. bei 4°C inkubiert. Nach Sedimentation der Matrix wurde die Konzentration des nicht gebundenen Rezeptors im Überstand durch PEG-Präzipitation (siehe 1.2.3.) gemessen.

2.5.0. Isolierung des DHP-Rezeptors

Die Ergebnisse in Tabelle VIII zeigen, daß die Solubilisierung des ^3H -Nitrendipin-Rezeptorkomplexes mit Digitonin ohne Aktivitätsverlust verläuft. Allerdings ist die Solubilisierung mit einem Protein- und damit auch Rezeptorverlust von 55%

Tabelle VIII

Reinigung des DHP-Rezeptors

Reinigungsstufe	DHP-Rezeptor [pmol]	Protein [%]	Protein [mg]	Spez. Akt. [pmol/mg]	Anreich.- faktor	Scatchard-Analyse B _{max} , [pmol/mg]
t-Tubuli	120	100	40	3,0	1	8,1
Digitonin-Extrakt	50	42	18	2,8	0,9	nd
WGA-Sephadex	18	16	0.16	110	37	nd
DEAE-Sephadex	4	3	0.01	400	133	2400

Der DHP-Rezeptor wurde mit 8 - 10 nM ^3H -Nitrendipin markiert und wie in Abschnitt 1.1. beschrieben aufgereinigt. In der Tabelle sind die Werte von 5 verschiedenen Isolierungen zusammengefaßt. Die Werte für die Spezifische Aktivität sind nicht um die Dissoziation des ^3H -Nitrendipin-Rezeptorkomplexes während der Aufarbeitung korrigiert. Der B_{max}-Wert für die letzte Aufreinigungsstufe (DEAE-Sephadex) wurde mit PN 200-110 ermittelt.

verbunden. Ferner konnte auch nur der vorgeformte ^3H -Nitrendipin-Rezeptorkomplex solubilisiert werden. Digitonin-Extrakte aus nicht markierten t-Tubuli Membranen konnten mit ^3H -Nitrendipin nicht nachmarkiert werden (vermutlich auf Grund der hohen unspezifischen Bindung an Digitonin-Vesikel (Curtis & Catterall, 1983)). Die Bindungsexperimente mit Digitonin-solubilisiertem DHP-Rezeptor wurden deshalb mit dem DHP PN 200-110 durchgeführt, das vermutlich auf Grund seiner um den Faktor 9 höheren Affinität (siehe Abb. 6A und 6C) auch an den Digitonin-solubilisierten Rezeptor bindet.

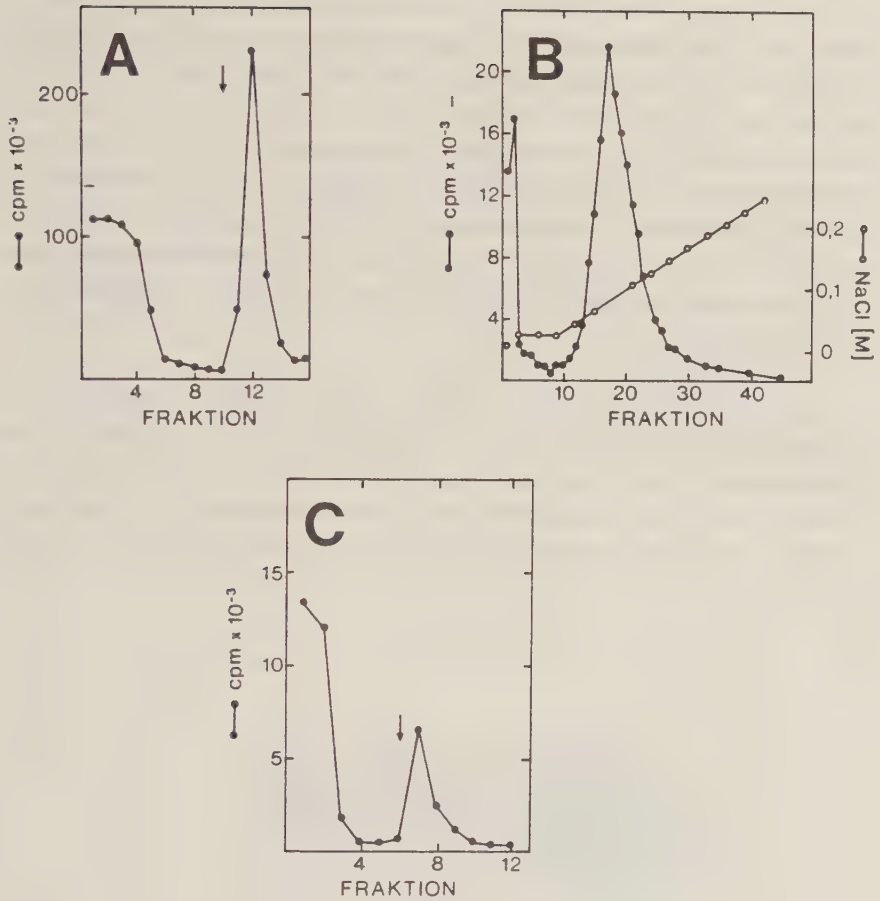


Abb. 12: Säulenprofile der verschiedenen Reinigungsstufen. Es wurden 43 mg t-Tubuli Membranen mit 9,3 nM ^3H -Nitrendipin markiert. Die Isolierung des DHP-Rezeptors wurde wie in Abschnitt 1.1. beschrieben durchgeführt. Jeweils 20 μl -Aliquots der Säulenfraktionen wurden gezählt. Die Radioaktivitätsangabe in den Säulenprofilen bezieht sich auf ein Volumen von 0,5 ml.

(**A**) WGA-Sephacrose I ; Fraktion 1-10: 7 ml; Fraktion 11-16: 2 ml; Der Pfeil kennzeichnet den Elutionsbeginn mit Puffer-K (100 mM NAGA). (**B**) DEAE-Sephadex ; Fraktion 1-5: 5 ml; Fraktion 6-45: 1,1 ml; Der Pfeil markiert den Beginn des NaCl-Gradienten. (**C**) WGA-Sephacrose II ; Fraktion 1-5: 6 ml; Fraktion 6-15: 0,6 ml; Der Pfeil zeigt den Elutionsbeginn mit Puffer-N (200 mM NAGA).

Der DHP-Rezeptor wurde über zwei Isolierungsschritte aufgereinigt (Abb. 12, Tabelle VIII). Der solubilisierter ^3H -Nitrendipin-Rezeptorkomplex wurde zuerst im Überschuß an die WGA-Sepharose Matrix absorbiert (siehe 2.4.0.). Die Matrix wurde von nicht gebundenem ^3H -Nitrendipin-Rezeptorkomplex, freiem ^3H -Nitrendipin und dem größten Teil des Membranproteins freigewaschen und mit 100 mM NAGA eluiert (Abb. 12A). Im Eluat befindet sich der Rezeptor mit einer um den Faktor 40 angestiegenen spezifischen Aktivität. Diese hohe Anreicherung läßt sich durch einen geringen Anteil an WGA-bindenden Glycoproteinen in t-Tubuli Membranen und durch die Minimierung der unspezifischen Bindung an die WGA-Matrix ($\sim 20\%$ Überschuß an DHP-Rezeptor) erklären.

Bei geringer Ionenstärke wird der ^3H -Nitrendipin-Rezeptor an DEAE-Sephadex absorbiert und mit einem linearen NaCl-Gradienten eluiert (Abb. 12B). Der ^3H -Nitrendipin-Rezeptor eluiert bei 75 ± 25 mM NaCl, einer deutlich höheren Ionenstärke als der von Curtis & Catterall (1984) publizierten (40 ± 10 mM). In Abb. 13 sind die Proteinkomponenten der verschiedenen Isolierungsschritte

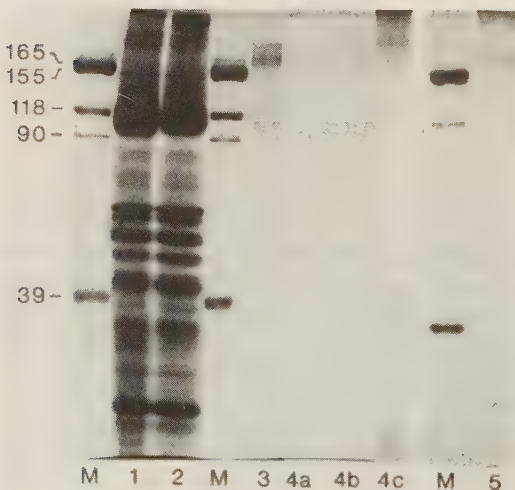


Abb. 13: SDS-Gel-Analyse der verschiedenen DHP-Rezeptor Aufreinigungsstufen.

Von den verschiedenen Aufreinigungsstufen wurden Aliquots entnommen und mit SDS-Probenpuffer unter reduzierenden Bedingungen (20 mM DTT/Puffer-R) inkubiert (Ausnahme: die Probe in Spur 4c wurde unter nicht-reduzierenden Bedingungen (20 mM NEMA) inkubiert). Die Proben wurden auf einem 8,75 %igen PAA-Gel analysiert. Die Spuren 1 - 4b wurden mit Serva Blau angefärbt. Die Silberfärbung wurde bei den Spuren 4c und 5 angewandt. Spur 1 : t-Tubuli-Membranprotein (20 µg Protein); Spur 2 : Digitonin-Extrakt (20 µg Protein); Spur 3 : Eluat der WGA-Sepharose I Säulenchromatographie (2 µg Protein); Spur 4a : Eluat der DEAE-Sephadex Säulenchromatographie (1 µg Protein); Spur 4b : Eluat der DEAE-Sephadex Säulenchromatographie, dem zusätzlich Thyroglobulin als internes Standardprotein (330 kDa) zugesetzt wurde; Spur 4c : Eluat der DEAE-Sephadex Säulenchromatographie (60 ng Protein), die Probe wurde unter nicht-reduzierenden Bedingungen analysiert; Spur 5 : Eluat der WGA-Sepharose II Säulenchromatographie (100 ng Protein); Spur M : Standardproteine.

analysiert. Mit der DHP-Bindungsaktivität (Abb. 12) koeluierten zwei hochmolekulare Polypeptide mit Molekulargewichten von 195 kDa und 148 kDa (Abb. 13, Spur 4a und 4b). Unter nicht-reduzierenden Bedingungen wandert der Rezeptor als eine einzige Bande bei ~ 300 kDa (Abb. 13, Spur 4c). Die beiden hochmolekularen Polypeptide (195 kDa und 148 kDa) sind vermutlich im nativen Rezeptor über Disulfid-Brücken miteinander verknüpft.

Die Sättigung des gereinigten DHP-Rezeptors (Eluat der DEAE-Sephadex-Chromatographie) mit ^3H -PN 200-110 ist in Abb. 14 (I und II) gezeigt. Die

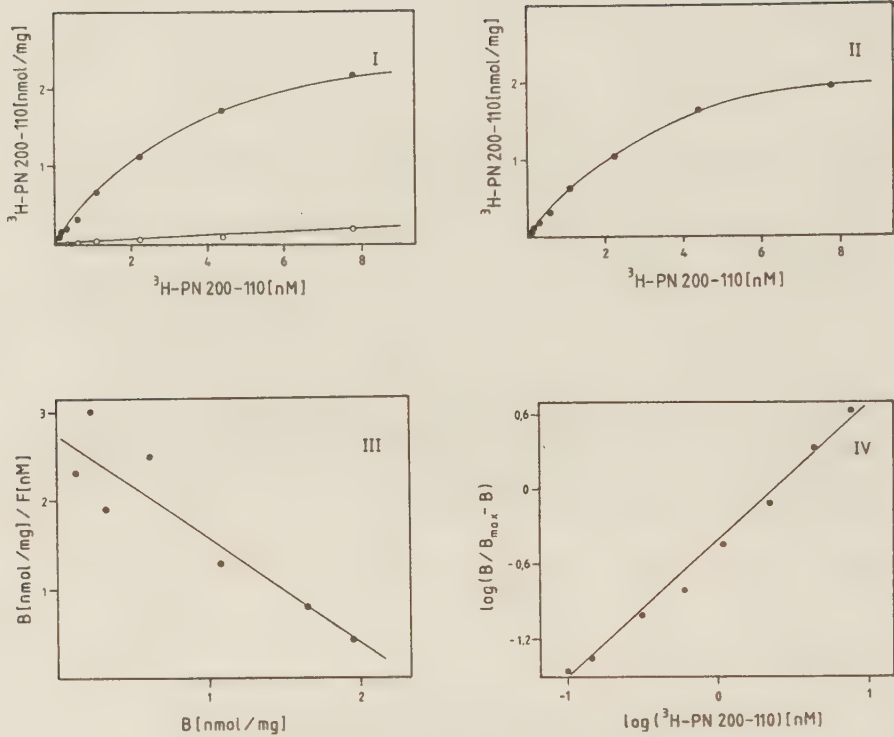


Abb. 14: Bindung von $^3\text{H-PN 200-110}$ an den aufgereinigten DHP-Rezeptor. Der DHP-Rezeptor wurde über WGA-Sephadex und DEAE-Sephadex Säulenchromatographie aufgereinigt (siehe 1.1.). Das Eluat der DEAE-Sephadex Säule (1 μg Protein/ml) wurde für 90 Min. bei 4°C mit 0,1 nM - 8 nM $^3\text{H-PN 200-110}$ inkubiert. In Parallelansätzen wurde mit 1 μM PN 200-110 kompetiert. Die Bindung wurde über PEG-Präzipitation (siehe 1.2.3.) bestimmt.

I Bindungskurve

(●—●) totale Bindung

(○—○) unspezifische Bindung

II Bindungskurve

(●—●) spezifische Bindung

III Auftragung der Daten nach SCATCHARD

IV Auftragung der Daten nach HILL

unspezifische Bindung beträgt $< 10\%$ der totalen Bindung. Aus der Scatchard-Analyse (Abb. 14 III) ergibt sich eine Gleichgewichtskonstante (k_D) von 0,9 nM für ^3H -PN 200-110 und ist damit identisch zur Gleichgewichtskonstanten, die für den membrangebundenen Rezeptor erhalten wurde (Abb. 6 C). Auch der Hill-Koeffizient ($n = 1,1$ für PN 200-110, Abb. 14 IV) ist unverändert. Die identischen Bindungseigenschaften und das Auftreten der hochmolekularen Polypeptide (ohne kleine, fragmentierte Peptide) deuten darauf hin, daß der Rezeptor durch die Solubilisierungs- und Aufreinigungsprozedur nicht degradiert, sondern in seiner intakten Form isoliert wurde.

Aus dem Scatchard-Diagramm (Abb. 14 III) wird ein Wert von 2,4 nmol Rezeptor/mg Protein für den aufgereinigten Rezeptor abgeleitet. Wenn für den Rezeptorkomplex ein Molekulargewicht von ~ 340 kDa (Σ 195 kDa und 148 kDa) angenommen wird, so ergibt sich für diese Präparation nach der Scatchard-Analyse eine Reinheit von $\sim 80\%$ und ein Anreicherungsfaktor von 300 (Tabelle VIII). Im Gegensatz zu publizierten Verfahren (Galizzi et al., 1986; Curtis & Catterall, 1984) genügen zwei chromatographische Reinigungsstufen, den DHP-Rezeptor aufzureinigen. Eine anschließende WGA-Sepharose Chromatographie führt zu keiner weiteren Aufreinigung des DHP-Rezeptors (vgl. in Abb. 13, Spur 4 und 5). Die Proteinbande bei ~ 120 kDa, die in einigen Präparationen beobachtet wurde (Abb. 13, Spur 4a und 4b), ist kein integraler Bestandteil des DHP-Rezeptors, sondern als Hauptprotein der t-Tubuli Membran eine mitgeschleppte Kontamination (Borsotto et al., 1985). Der isolierte, intakte DHP-Rezeptor ist ein Komplex aus zwei hochmolekularen Polypeptiden, mit Molekulargewichten von 195 kDa und 148 kDa.

2.6.0. Charakterisierung des aufgereinigten DHP-Rezeptors

Die geforderte (Glossmann et al., 1985 a ; Ruth et al., 1985 und Borsotto et al., 1984 a) und für den membrangebundenen Rezeptor auch gezeigte (Abb. 7) allosterische Modulation der DHP-Bindung, wurde auch für den gereinigten Rezeptor gefunden. In Abb. 15 ist die allosterische Regulation der ^3H -PN 200-110-Bindung des gereinigten Rezeptor durch die Calciumkanal-Antagonisten Diltiazem und Verapamil dargestellt. Verapamil führt zu einer partiellen Inhibierung der PN 200-110-Bindung und unterdrückt ebenfalls den stimulierenden Effekt von Diltiazem. Der gereinigte

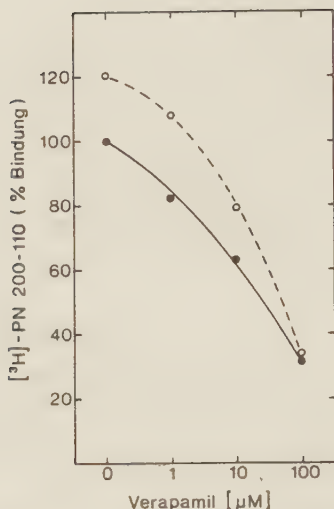


Abb. 15: Allosterische Wechselwirkung am gereinigten Rezeptor. Der DHP-Rezeptor wurde über WGA-Sephadex und DEAE-Sephadex Säulenchromatographie aufgereinigt (siehe 1.1.). Das Eluat der DEAE-Sephadex Säule (0,4 µg Protein/ml) wurde für 2 Std. bei 37°C mit 2,4 nM ^3H -PN 200-110 (●) oder mit 2,4 nM ^3H -PN 200-110 und 10 µM Diltiazem (○) mit den angezeigten Konzentrationen an Verapamil inkubiert. Die Bindung wurde durch PEG-Präzipitation (siehe 1.2.3.) bestimmt.

Rezeptor besitzt also Bindungsstellen für Dihydropyridine, Verapamil und Diltiazem.

Die Stimulierung bzw. die Inhibition durch die Calciumkanal-Antagonisten ist auf eine Änderung der Dissoziationskinetik zurückzuführen (Abb. 8). Auch beim gereinigten Rezeptor ändern sich durch den allosterischen Einfluß die Dissoziationskinetiken (Abb. 16). Sie werden durch Diltiazem verlangsamt und durch Verapamil beschleunigt. In Tabelle IX sind die Dissoziationskonstanten aufgelistet und den Werten des membrangebundenen Rezeptors gegenübergestellt. Der Anteil des langsam dissoziierenden, rezeptorgebundenen Liganden hat sich auf 50% erhöht. Die kinetischen Parameter des Rezeptors haben sich durch die Solubilisierung und die chromatographische Aufreinigung nicht verändert (k_{-1} und k_{-2} von PN 200-110 sind nach der Isolierung unverändert). Allein die Stärke der allosterischen Effekte hat sich

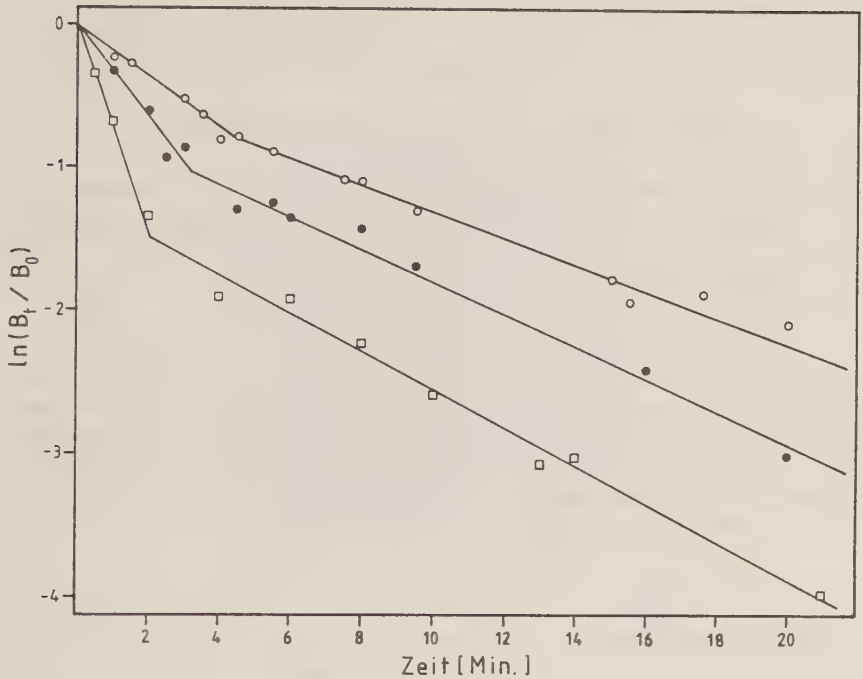


Abb. 16: Dissoziationskinetik des gereinigten Rezeptors. Der DHP-Rezeptor wurde über WGA-Sepharose und DEAE-Sephadex Säulenchromatographie (siehe 1.1.) isoliert. Das Eluat der DEAE-Sephadex Säule (0,8 µg/ml) wurde mit ^3H -PN 200-110 (●), und zusätzlich 100 µM Diltiazem (○) oder 10 µM Verapamil (◻) für 2 Std. bei 37°C inkubiert. Die Dissoziation wurde durch Zugabe von nicht markiertem PN 200-110 (Endkonzentration 1 µM) eingeleitet. Die Bindung wurde durch PEG-Präzipitation bestimmt.

geändert. Vermutlich ist die Änderung der absoluten Werte auf die geänderte Umgebung des Rezeptors zurückzuführen (Lipid/Digitonin-Vesikel). Der Rezeptor ist also, zumindest in Bezug auf seine Bindungsparameter, in seiner nativen, nicht degradierten Form isoliert worden.

Tabelle IX

Kinetische Parameter der Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung

	PN 200-110		+ Diltiazem		+ Verapamil	
	Rezeptor	t-Tubuli	Rezeptor	t-Tubuli	Rezeptor	t-Tubuli
k_{-1}	$0,32 \pm 0,01$ (50%)	$0,35 \pm 0,05$ (90%)	$0,17 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,01$	$0,77 \pm 0,05$	$0,68 \pm 0,05$
k_{-2}	$0,11 \pm 0,01$ (50%)	$0,13 \pm 0,03$ (10%)	$0,09 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,01$	$0,24 \pm 0,03$

Die Dissoziationskonstanten (k_{-1} und k_{-2}) wurden aus den in Abb. 8 und Abb. 16 dargestellten Experimenten ermittelt. Beachte: Die Dissoziation des PN 200-110 vom membrangebundenen Rezeptor wurde mit 100 μ M Verapamil, die des gereinigten Rezeptors nur mit 10 μ M Verapamil gemessen. Die Werte in den Klammern geben den Anteil des rezeptorgebundenen Liganden an, der schnell (k_{-1}) bzw. langsam (k_{-2}) abdissoziiert.

2.7.0. Affinitätsmarkierung

2.7.1. Photoaffinitätsmarkierung mit ^3H -Azidopin

Die DHP-bindende Untereinheit des Rezeptors wurde photochemisch mit ^3H -Azidopin, einem DHP-Liganden mit einer Azidogruppe, quervernetzt (siehe 1.3.0.). Sowohl t-Tubuli Membranen (Abb. 17A), als auch der über WGA-Sepharose Chromatographie angereicherte Rezeptor (Abb. 17B) wurden mit ^3H -Azidopin irreversibel markiert. In beiden Fällen wird spezifisch das 195 kDa-Polypeptid markiert, welches zusammen mit dem 148 kDa-Polypeptid den DHP-Rezeptorkomplex bildet. Die Bestrahlungsausbeuten lagen bei $\sim 2\%$ für den membrangebundenen und stiegen auf $\sim 6\%$ für den aufgereinigten Rezeptor.

Da der DHP-Rezeptor unter nicht-reduzierenden Bedingungen als ein hochmolekularer Komplex bei ~ 300 kDa auf dem SDS-PAA-Gel wandert (Abb. 13, Spur 4c), sollte auch die mit ^3H -Azidopin kovalent markierbare Proteinbande (195 kDa) unter nicht-reduzierenden Bedingungen im ~ 300 kDa-Komplex wandern. In Abb. 18A ist eine Fluorographie des ^3H -Azidopin markierten Rezeptors unter nicht-reduzierenden (Abb. 18A, Spur 1) und reduzierenden (Abb. 18A, Spur 2) Bedingungen gezeigt. In

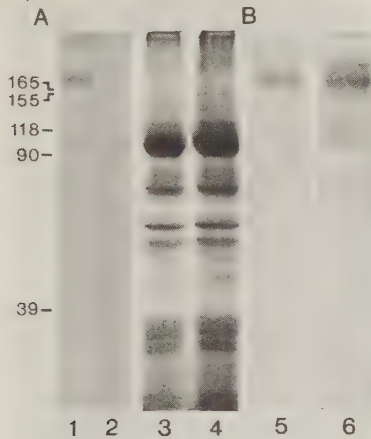


Abb. 17: Photoaffinitätsmarkierung mit ^3H -Azidopin. (A) T-Tubuli Membranen wurden mit 5 nM ^3H -Azidopin für 90 Min. bei 4^0C inkubiert (Spur 1 und 3). Ein Parallelansatz wurde mit 1 μM Nitrendipin kompetiert (Spur 2 und 4). Nach der Bestrahlung (siehe 1.3.1.) wurden die markierten Proteine auf einem 8,75%igen SDS-PAA-Gel unter reduzierenden Bedingungen analysiert. Das Gel wurde mit Serva Blau angefärbt (Spur 3 und 4) und anschließend fluorographiert (Spur 1 und 2). Der Röntgenfilm wurde 7 Tage belichtet. (B) Der ^3H -Azidopin-Rezeptorkomplex wurde über WGA-Sepharose Chromatographie angereichert. Das Eluat der Säule wurde direkt bestrahlt (siehe 1.3.2.). Die Gel-Elektrophorese (Spur 6) und die Fluorographie (Spur 5) sind wie unter (A) ausgeführt. Die Belichtungszeit betrug 40 Tage.

beiden Fällen wird nur die 195 kDa-Proteinbande spezifisch markiert. Um den Einfluß der Bestrahlung und der Radikalreaktion des aktivierten ^3H -Azidopins auf den ~ 300 kDa-Komplex zu untersuchen, wurde der gereinigte Rezeptor verschiedenen Reaktionsbedingungen ausgesetzt. In Abb. 18B ist ein silbergefärbtes Proteingel des

in Gegenwart (Abb. 18B, Spur 4) und in Abwesenheit (Abb. 18B, Spur 5) von ^3H -Azidopin bestrahlten ~ 300 kDa-Rezeptorkomplexes gezeigt. Zum Vergleich ist in Abb. 18B, Spur 3, der nicht bestrahlte Komplex gezeigt. Daraus wird deutlich, daß die Bestrahlung an sich keinen Einfluß auf den Rezeptorkomplex hat. Es wäre aber denkbar, daß durch die Radikalreaktion des ^3H -Azidopins der 300 kDa-Komplex fragmentiert wird (in 195 kDa und 148 kDa Polypeptide). Bei einer Bestrahlungsausbeute von nur 6% wäre die erwartete 195 kDa-Bande aber viel zu schwach, um auf dem SDS-PAA-Gel durch Silberfärbung erkannt zu werden (Abb. 18B, Spur 5). Die Möglichkeit, daß es zwei 195 kDa-Polypeptide gibt, kann bei der Reinheit der Präparation ($\sim 80\%$) ausgeschlossen werden.

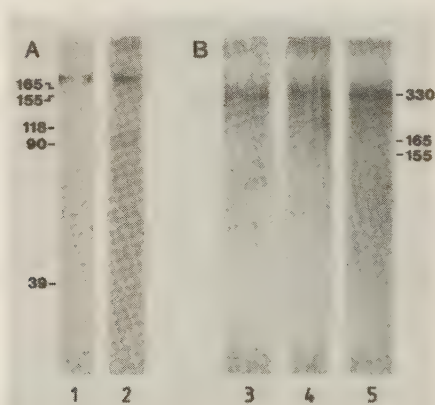


Abb. 18 : Bestrahlung des ~ 300 kDa - Proteins. (**A**) Fluorographie des ^3H -Azidopin markierten Rezeptors. T-Tubuli Membranen wurden mit ^3H -Azidopin markiert, bestrahlt und auf einem SDS-PAA-Gel untersucht (Details siehe Abb. 17). Der irreversibel markierte Rezeptor wurde unter nicht- reduzierenden (20 mM NEMA, Spur 1) und reduzierenden (20 mM DTT, Spur 2) Bedingungen analysiert. Der Röntgenfilm wurde 7 Tage (Spur 1) bzw. 27 Tage (Spur 2) belichtet. (**B**) Silberfärbung des isolierten 330 kDa-Proteins. Der DHP-Rezeptor wurde wie in Abschnitt 1.1.5. beschrieben über WGA-Sephadex und DEAE-Sephadex Chromatographie isoliert. Aus dem Eluat der DEAE-Säule wurden Aliquots entnommen (100 ng Protein/Aliquot) und in Gegenwart (Spur 4) bzw. in Abwesenheit (Spur 5) von 5 nM ^3H -Azidopin für 2 Min. bestrahlt (siehe 1.3.1.). Die Proben wurden auf dem Gel unter nicht-reduzierenden Bedingungen (20 mM NEMA) analysiert und mit Silber gefärbt. In Spur 3 ist zum Vergleich das nicht bestrahlte ~ 300 kDa-Protein aus dem DEAE-Eluat aufgetragen.

2.7.2. Limitierte Proteolyse

Der membrangebundene DHP-Rezeptor (inside-out-Vesikel) wurde mit ^3H -Azidopin photochemisch quervernetzt und mit *Staphylococcus aureus* V_8 -Protease oder α -Chymotrypsin anverdaut. Unter diesen Bedingungen ist nur die cytoplasmatische Seite des DHP-Rezeptors den Proteasen zugänglich. Die limitierte Proteolyse (1 Std., 4°C) wurde mit SDS und β -Mercaptoethanol beendet. Das Molekulargewicht der entstandenen Peptide wurde auf einem 8,75%igen SDS-PAA-Gel (Abb. 19A und 20A) mit anschließender Fluorographie (Abb. 19B und 20B) ermittelt.

In Tabelle X sind die Molekulargewichte der erhaltenen Peptide zusammengefaßt. Sowohl mit V_8 -Protease als auch mit α -Chymotrypsin werden Fragmente um 50 kDa und um 30 - 35 kDa erhalten. Die limitierte Proteolyse und die limitierte Zugänglichkeit der Proteasen (cytoplasmatische Seite des Rezeptors) bewirken anscheinend, daß nur bestimmte Bereiche der Polypeptidkette von den Proteasen erkannt und gespalten werden können. Da dieser Verdauungsansatz unter nicht denaturierenden Bedingungen durchgeführt wurde, ist es also möglich, daß intrinsische Proteasen z.B. während der Membranpräparation ähnliche Fragmentierungsprodukte erzeugen. Peptide dieser Molekulargewichtsbereiche wurden häufig als DHP-Rezeptor-Untereinheiten in aufgereinigten und affinitätsmarkierten Präparationen beobachtet (Borsotto et al., 1984b ; Curtis & Catterall, 1984 ; Goll et al., 1983).

Tabelle X

Molekulargewichte der proteolytischen Fragmente
des DHP-Rezeptors

DHP-Rezeptor	V_8 -Protease	α -Chymotrypsin
195.000	195.000	195.000
		102.000
	81.000	93.000
	55.000	48.000
	35.000	35.000
	32.000	30.000

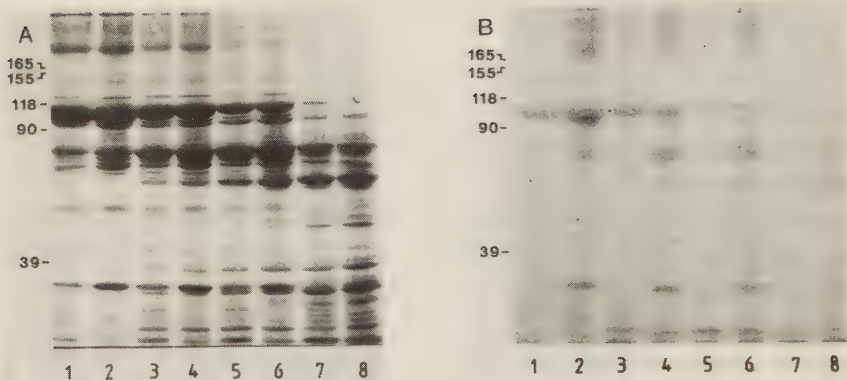


Abb. 19 : Limitierte Proteolyse mit V_8 -Protease. T-Tubuli Membranen wurden mit $8,7 \text{ nM } ^3\text{H}$ -Azidopin markiert, für 3 Min. bestrahlt und mit V_8 -Protease bei 4°C verdaut (siehe 1.4.0.). Jeweils $140 \text{ }\mu\text{g}$ Membranprotein wurden mit $0,5 \text{ }\mu\text{g}$ (Spur 1 und 2), $2,5 \text{ }\mu\text{g}$ (Spur 3 und 4), $5,0 \text{ }\mu\text{g}$ (Spur 5 und 6) und $10 \text{ }\mu\text{g}$ (Spur 7 und 8) V_8 -Protease in einem Volumen von $60 \text{ }\mu\text{l}$ inkubiert. Die Verdauungsprodukte wurden auf einem $8,75\%$ igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt, mit Serva Blau angefärbt (**A**) und fluorographiert (**B** , Belichtungszeit: 40 Tage). In Parallelansätzen wurde mit $1 \text{ }\mu\text{M}$ PN 200-110 kompetiert (Spur 1, 3, 5 und 7).

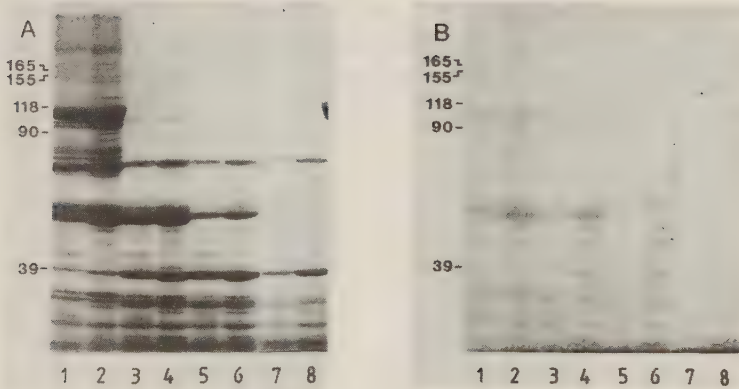


Abb. 20 : Limitierte Proteolyse mit α -Chymotrypsin. T-Tubuli Membranen wurden mit $8,7 \text{ nM } ^3\text{H}$ -Azidopin markiert, für 3 Min. bestrahlt und mit α -Chymotrypsin bei 4°C verdaut (siehe 1.4.0.). Jeweils $140 \text{ }\mu\text{g}$ Membranprotein wurden mit $0,5 \text{ }\mu\text{g}$ (Spur 1 und 2), $2,5 \text{ }\mu\text{g}$ (Spur 3 und 4), $5,0 \text{ }\mu\text{g}$ (Spur 5 und 6) und $10 \text{ }\mu\text{g}$ (Spur 7 und 8) α -Chymotrypsin in einem Volumen von $60 \text{ }\mu\text{l}$ inkubiert. Die Verdauungsprodukte wurden auf einem $8,75\%$ igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt, mit Serva Blau angefärbt (A) und fluorographiert (B, Belichtungszeit: 40 Tage). In Parallelansätzen wurde mit $1 \text{ }\mu\text{M}$ PN 200-110 kompetiert (Spur 1, 3, 5 und 7).

2.7.3. Photoaffinitätsmarkierung mit ^3H -Nimodipin

Neben der relativ milden Bestrahlung mit ^3H -Azidopin, wurde auch versucht, den Rezeptor mit ^3H -Nimodipin photochemisch querverzernetzen. Dazu wurde eine Quecksilberdampf-Hochdrucklampe als Energie-Quelle benutzt (Nalik, 1984), wobei die Gefahr der Fragmentierung durch die hohe Bestrahlungsdosis ($3,6\text{W}/\text{cm}^2$) nicht auszuschließen war. In Abb. 21 ist die Optimierung der Bestrahlungsdauer gezeigt. Bei einer Bestrahlungsdauer von 40 Sek. ist der spezifische Einbau von ^3H -Nimodipin in t-Tubuli Membranen am größten. Der Anteil der unspezifischen Bindung ist mit $\sim 80\%$ der totalen Bindung sehr groß. Die entsprechenden Bestrahlungsprodukte sind auf einem SDS-PAA-Gel (Abb. 22A, Spur 3 und 4) mit anschließender Fluorographie (Abb. 22A, Spur 1 und 2) analysiert worden. Nahezu

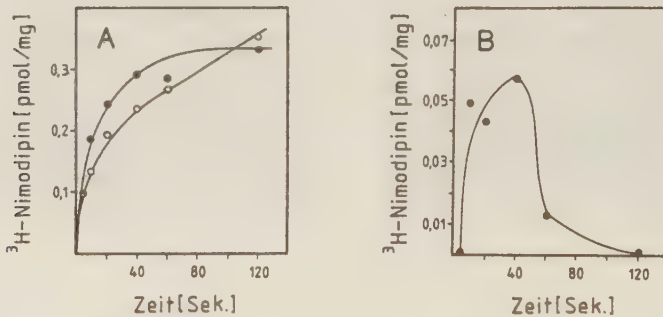


Abb. 21: Zeitabhängigkeit der Photoaffinitätsmarkierung mit ^3H -Nimodipin. T-Tubuli Membranen (230 $\mu\text{g}/\text{ml}$) werden in 150 mM NaCl/50 mM Tris, HCl pH 7.4 mit 5 nM ^3H -Nimodipin für 90 Min. bei 4°C markiert. Ein Parallelansatz wurde mit 1 μM Nimodipin kompetiert. Die Membranen wurden bestrahlt (siehe 1.3.1.) und die Bestrahlungsausbeute wurde durch TCA-Fällung bestimmt.

A Bindungskurve

(●—●) totale Bindung

(○—○) unspezifische Bindung

B Bindungskurve

(●—●) spezifische Bindung

alle Membranproteine wurden mit ^3H -Nimodipin markiert. Es ist keine spezifische Markierung eines einzelnen Proteins zu erkennen. Deshalb wurde der ^3H -Nimodipin-Rezeptorkomplex mit Digitonin solubilisiert, über WGA-Sepharose chromatographiert und in dieser angereicherten Form bestrahlt (siehe 1.3.0.). Unter diesen Bedingungen wurde ein ~ 26 kDa Peptid markiert (Abb. 22B, Spur 5). Durch die geringe Bestrahlungsausbeute von 0,2% erscheint es zweifelhaft, daß hier der intakte DHP-Rezeptor markiert wurde. Die Ergebnisse lassen eher den Schluß zu, daß diese Bestrahlung zu einer Photolyse des ^3H -Nimodipin-bindenden Proteins führt.

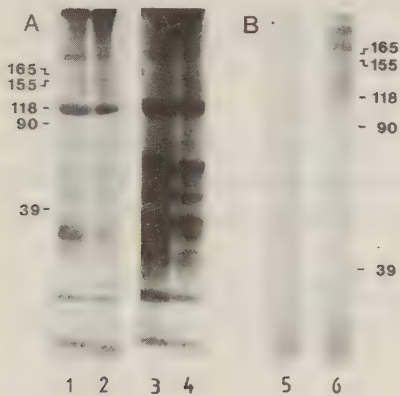


Abb. 22 : Photoaffinitätsmarkierung mit ^3H -Nimodipin. (**A**) T-Tubuli Membranen wurden mit 10 nM ^3H -Nimodipin markiert (Spur 1 und 3). Ein Parallelansatz wurde mit 1 μM Nimodipin kompetiert (Spur 2 und 4). Nach der Bestrahlung wurden die ^3H -Nimodipin markierten Peptide unter reduzierenden Bedingungen (20 mM DTT) auf einem 8,75%igen SDS-PAA-Gel analysiert. Das Gel wurde mit Serva Blau gefärbt (Spur 3 und 4) und anschließend fluorographiert (Spur 1 und 2). Der Röntgenfilm wurde 40 Tage belichtet. (**B**) T-Tubuli Membranen wurden mit 10 nM ^3H -Nimodipin markiert. Das markierte Membranprotein wurde dann mit Digitonin solubilisiert und über WGA-Sepharose chromatographiert. Der angereicherte ^3H -Nimodipin-Rezeptorkomplex wurde bestrahlt und auf einem SDS-PAA-Gel analysiert. Die Fluorographie (Spur 5) und die Protein-Färbung (Spur 6) wurden wie in (**A**) durchgeführt.

2.8.0. Modulation der DHP (Agonist/Antagonist) - Bindung

Der DHP-Rezeptor besitzt sämtliche bekannten Strukturmerkmale eines Kanal-Proteins (Tanabe et al., 1987). Deshalb ist es wahrscheinlich, daß der DHP-Rezeptor mit dem Calciumkanal identisch ist. Der Calciumkanal besitzt mindestens zwei spezifische Bindungsstellen für Calciumionen (Tsien et al., 1987). Auch für die DHP-Bindung an den Rezeptor wird ein Einfluß von Calciumionen beschrieben (Gould et al., 1984 ; Fosset et al., 1983 ; Ptasiński et al., 1985 ; Galizzi et al., 1985). Die publizierten Daten sind aber sehr kontrovers. Es wurden sowohl stimulierende (Galizzi et al., 1985) als auch inhibierende (Fosset et al., 1983) Effekte von Calciumionen auf die DHP-Bindung beschrieben.

Durch eine gezielte Veränderung der Calciumkonzentration an der cytoplasmatischen oder an der extrazellulären Seite des Rezeptors kann gezeigt werden, daß diese vermeintlichen Unterschiede teils auf spezifischen Effekten von Calciumionen an dem Rezeptor und teils auf unspezifischen Effekten von Calciumionen an der Membran beruhen.

In Abb. 23 ist die Orientierung des Rezeptors in den verschiedenen Vesikeln gezeigt. Die nach der Rib-Press-Methode isolierten t-Tubuli Membranen haben die

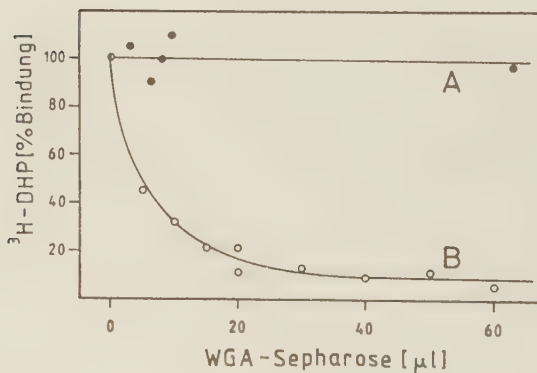


Abb. 23 : Bestimmung der Rezeptor-Orientierung. Der membrangebundene (Δ) und der in Digitonin-Vesikel integrierte Rezeptor ($\square$) wurden mit steigenden Mengen WGA-Sepharose inkubiert. Der gebundene Rezeptor wurde mit der Matrix entfernt, und die Konzentration des verbleibenden, nicht gebundenen Rezeptors wurde mit PN 200-110 oder Nitrendipin bestimmt. Details zur experimentellen Ausführung siehe Legende zu Abb. 5 und Abb. 11.

cytoplasmatische Seite exponiert (Abb. 23A, inside - out). Die Solubilisierung führt dagegen zu Digitonin-Vesikeln, die den Rezeptor mit der extrazellulären Seite exponiert haben (Abb. 23B, outside - out). Mit diesen beiden Vesikelpräparationen ist es also möglich, die cytoplasmatische bzw. die extrazelluläre Seite des Rezeptors selektiv bestimmten Bedingungen auszusetzen.

Der Einfluß von Calcium-Chelatbildnern, die zu der cytoplasmatischen Seite gegeben wurden, auf die PN 200-110-Bindung ist in Abb. 24 gezeigt. Die Bindung von PN 200-110 an den Rezeptor wird durch EGTA/EDTA um $\sim 30\%$ stimuliert. Um den gleichen

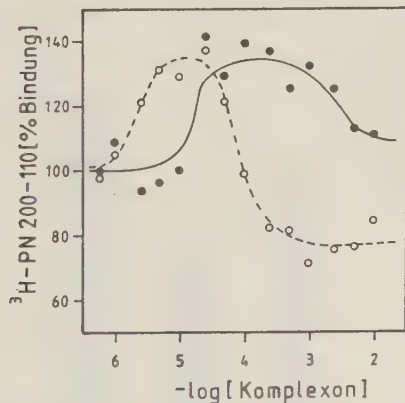


Abb. 24: Modulation der ^3H -PN 200-110 - Bindung durch EGTA/EDTA. T-Tubuli Membranen (20 μg Protein/ml) wurden in Puffer-D für 2 Std. bei 37°C mit 1,1 nM ^3H -PN 200-110 und den angezeigten Konzentrationen an EGTA (●) oder EDTA (○) markiert (Konkurrenz mit 1 μM PN 200-110). Die Bindung wird als prozentuale Änderung zu dem Wert ohne Komplexon (= 100% Bindung) angegeben.

Faktor stimuliert der Calciumkanal-Antagonist Diltiazem die PN 200-110 Bindung (siehe Abb. 7). Ein Vergleich der EGTA- und der Diltiazem-stimulierten Bindung ist in Abb. 25 dargestellt. Die beiden Effekte sind additiv, beruhen also auf unterschiedlichen Ursachen. Das belegt auch das in Abb. 26 dargestellte Experiment, daß die Dissoziationskinetik mit und ohne EGTA-Stimulierung zeigt. Anders als Diltiazem (Abb. 8) verändert EGTA die Dissoziationskinetik des PN 200-110 nicht. Daß die Stimulierung auf eine Komplexierung von Calciumionen zurückzuführen ist, zeigt das Experiment in Abb. 27. Die EGTA-stimulierte Bindung (~120% Bindung) kann mit Calciumionen zurücktitriert werden (Abb. 27B), d.h., die Stimulierung der PN 200-110-Bindung durch EGTA ist auf das Komplexieren von Calciumionen zurückzuführen und kein Effekt von EGTA selbst. Mit Calciumionen kann aber auch die nicht stimulierte PN 200-110-Bindung titriert werden (Abb. 27A). Die Ergebnisse der in Abb. 24 und 27 gezeigten Experimente belegen, daß steigende Mengen von Calcium an der cytoplasmatischen Seite des Rezeptors (inside - out - Vesikel) die DHP-Bindung destabilisieren.

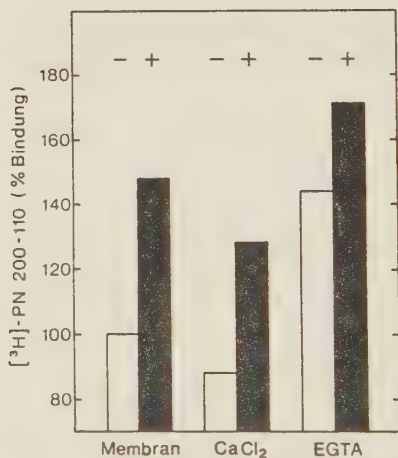


Abb. 25: Regulation der PN 200-110 - Bindung. Weißer Balken: T-Tubuli Membranen (50 µg Protein/ml) wurden in Puffer-D für 2 Std. bei 37°C mit 1,2 nM ³H-PN 200-110 markiert. Zusätzlich wurde entweder mit 1 mM CaCl₂ oder mit 1 mM EGTA inkubiert (Kompetitionsansatz mit 1 µM PN 200-110). Schwarzer Balken: In den Proben befanden sich zusätzlich 10 µM Diltiazem.

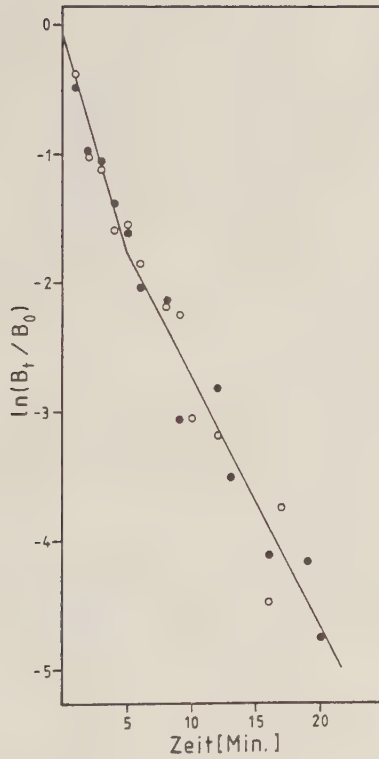


Abb. 26: Dissoziationskinetik nach EGTA-Stimulation. T-Tubuli Membranen (43 μg Protein/ml) wurden in Puffer-D mit 0,7 nM ^3H -PN 200-110 (●) oder mit 0,7 nM ^3H -PN 200-110 und 0,1 mM EGTA (○) für 2 Std. bei 37°C inkubiert. Die Dissoziation wurde durch Zugabe von 1 μM PN 200-110 eingeleitet und die Bindung wurde durch Filtration bestimmt.

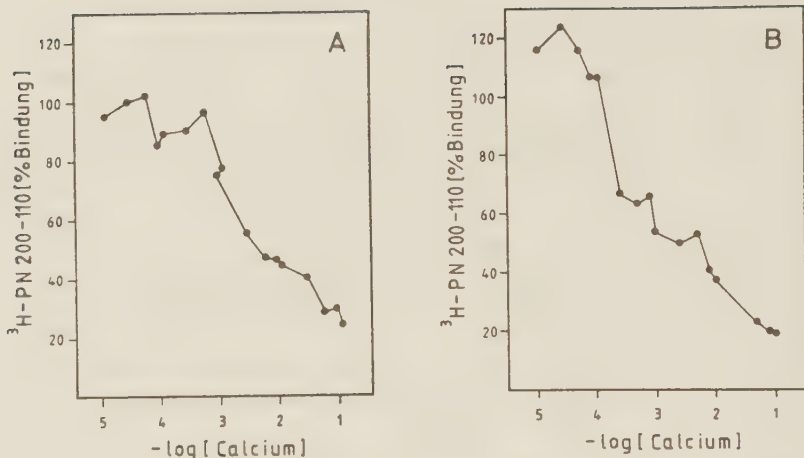


Abb. 27: Calciumentration der ³H-PN 200-110-Bindung. (A) T-Tubuli Membranen (32 µg Protein/ml) wurden in Puffer-D mit 0,9 nM ³H-PN 200-110 und steigenden CaCl₂-Konzentrationen für 2 Std. bei 37°C inkubiert. Ein Parallelansatz wurde mit 1 µM PN 200-110 kompetiert. Die spezifische Bindung (●—●) ist gezeigt.

(B) T-Tubuli Membranen (40 µg Protein/ml) wurden in Puffer-D mit 1,1 nM ³H-PN 200-110 und 0,1 mM EGTA versetzt und nach Zugabe steigender CaCl₂-Konzentrationen für 2 Std. bei 37°C inkubiert (Konkurrenz mit 1 µM PN 200-110). Gezeigt ist die spezifische Bindung (●—●).

Um zu überprüfen, ob diese Destabilisierung der Bindung ein spezifischer Effekt von Calcium oder ein unspezifischer (unselektiver) Ladungseffekt ist, wurde der Einfluß verschiedener zweiwertiger Ionen auf die PN 200-110-Bindung gemessen. Zum Vergleich wurden sowohl inside-out- als auch outside-out-Vesikel untersucht (Abb. 28). Werden die Ionen zu der cytoplasmatischen Seite gegeben (Abb. 28A), so haben alle untersuchten Salze den gleichen Effekt : Eine Destabilisierung der PN 200-110-Bindung. Vermutlich werden die negativ geladenen Phospholipide durch die Metallionen neutralisiert. Durch die resultierende Änderung der Membranstruktur wird auch der Rezeptor beeinflußt und die PN 200-110-Bindung wird destabilisiert.

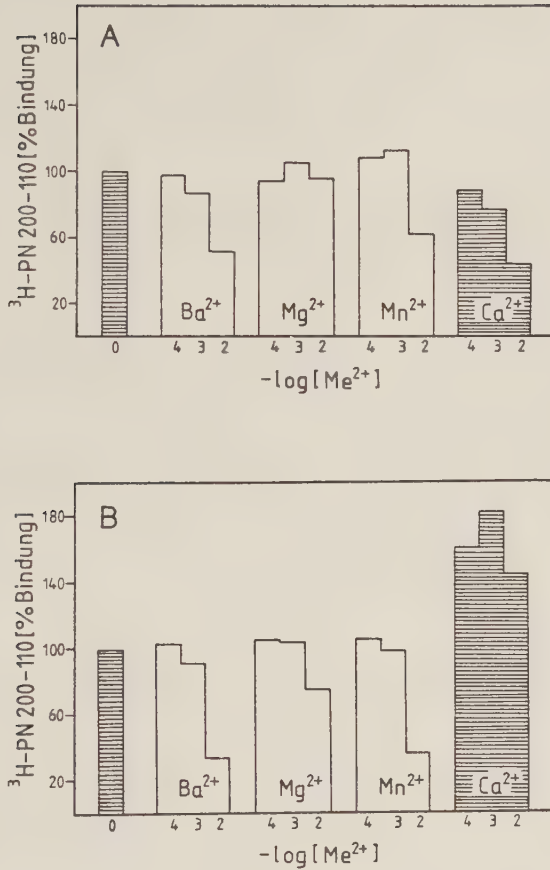


Abb. 28: Salz-Titration der PN 200-110 - Bindung. (**A**) T-Tubuli Membranen (100 µg Protein/ml) wurden in Puffer-D mit 0,6 nM ³H-PN 200-110 für 2 Std. bei 37°C mit den angegebenen Mengen an Ba²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺ und Ca²⁺ (als Chlorid-Salze) inkubiert (Konkurrenz mit 1 µM PN 200-110). Die spezifische Bindung wurde durch Filtration (siehe 1.2.2.) bestimmt. (**B**) Digitonin-Extrakt (100 µg Protein/ml) wurde in Puffer-H mit 1,1 nM ³H-PN 200-110 unter den in (**A**) beschriebenen Bedingungen inkubiert. Die spezifische Bindung wurde durch PEG-Fällung bestimmt (siehe 1.2.3.).

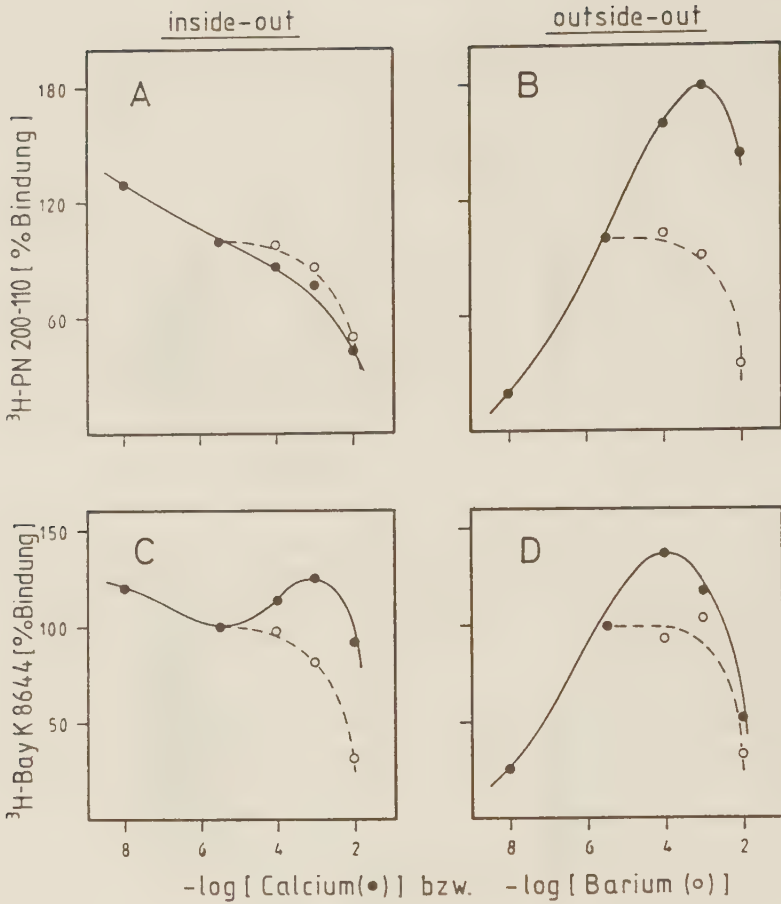


Abb. 29: Seltenspezifische Calcium/Barium-Regulation der Agonist/Antagonist-Bindung. T-Tubuli Membranen und Digitonin-Extrakte wurden mit dem Calciumkanal-Antagonisten PN 200-110 und dem Calciumkanal-Agonisten Bay K 8644 für 2 Std. bei 37°C in Gegenwart der angezeigten Konzentrationen an Barium (○—○) und Calcium (●—●) inkubiert. **A:** inside-out-Vesikel (T-Tubuli, 100 μg Protein/ml Puffer-D und **B:** outside-out-Vesikel (Digitonin-Extrakt, 100 μg Protein/ml Puffer-X) wurden mit 0,6 nM $^3\text{H-PN 200-110}$ inkubiert. **C:** inside-out-Vesikel (T-Tubuli, 134 μg Protein/ml Puffer-D) und **D:** outside-out-Vesikel (Digitonin-Extrakt, 160 μg Protein/ml Puffer-X) wurden mit 4,0 nM Bay K 8644 markiert. In Parallelansätzen wurde mit 1 μM PN 200-110 kompetiert. Der Wert für die spezifische Bindung wird relativ zu 100%-Bindung angegeben (ohne externe Salz-Zugabe, d.h. natürliche Kontamination durch Calcium = 3,5 μM , bestimmt durch Atomabsorptionsspektroskopie).

In Abb. 28B ist der Einfluß der Salze auf der extrazellulären Seite gezeigt. Die Kontrollsalze (Ba^{2+} , Mg^{2+} und Mn^{2+}) inhibieren auch hier die Bindung, vermutlich durch eine unspezifische Wechselwirkung mit der Membran (bzw. den Digitonin-Vesikeln). Anders ist die Reaktion mit Calciumionen. Die PN 200-110-Bindung wird stark stimuliert. Der Effekt ist Calcium-spezifisch.

Neben der calciumabhängigen PN 200-110-Bindung wurde zusätzlich die Bindung eines Calciumkanal-Agonisten (Bay K 8644) untersucht. In Abb. 29 ist die Calcium-Titration eines Antagonisten (PN 200-110) der eines Agonisten (Bay K 8644) gegenübergestellt. Die Titration mit Barium wurde dabei als Indikator für die unspezifische Wechselwirkung eines zweiwertigen Metallions mit der Membran durchgeführt. Für die Kalkulation des spezifischen Calciumeffektes wurde die durch die Barium-Titration ermittelte Abnahme der Bindung (als Maß für die unspezifische Bindung) zum gemessenen Wert der Calcium-Titration addiert. Die resultierende spezifische Bindung zeigt, daß sowohl der Agonist als auch der Antagonist (Abb. 30 A) für die Bindung an den Rezeptor Calciumionen an der extrazellulären Seite benötigen.

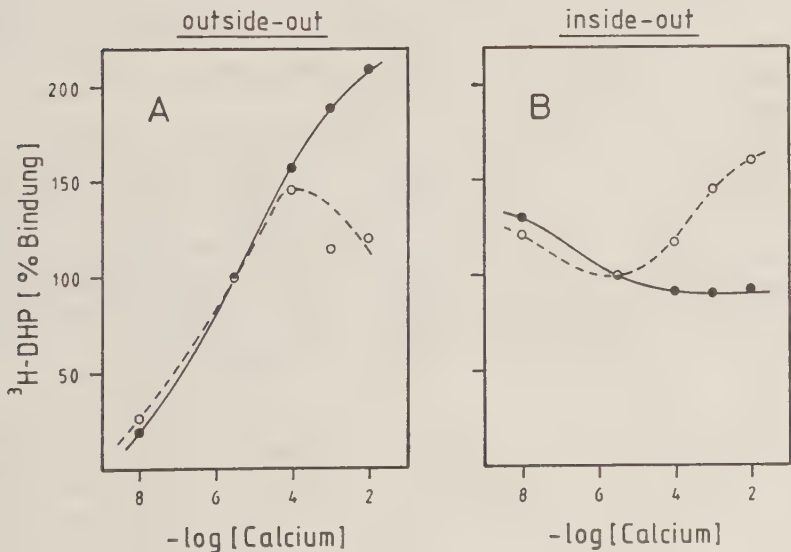


Abb. 30: Spezifischer Calciumeffekt auf die DHP(Agonist/Antagonist)-Bindung. Der für Calcium spezifische Effekt auf die DHP-Bindung wird aus den Bindungsdaten des in Abb. 29 beschriebenen Experiments kalkuliert. Dazu wird die Annahme gemacht, daß die Regulation der DHP-Bindung durch Calcium in einen für Calcium spezifischen Effekt und in einen unspezifischen Effekt eines bivalenten Kations zerlegt werden kann. Der unspezifische Effekt wird mit Barium als Kation ermittelt und die Differenz zum Kontrollwert (= 100% DHP-Bindung, ohne externe Salz-Zugabe) wird von den entsprechenden Bindungsdaten, die in Gegenwart von Calcium erhalten wurden, subtrahiert. Die resultierenden DHP-Bindungsdaten wurden gegen die eingesetzten Calciumkonzentration aufgetragen. Gezeigt ist die spezifische Bindung des Antagonisten (• - • , PN 200-110) und des Agonisten (○ - ○ , Bay K 8644) in Abhängigkeit von Calcium, das mit der extrazellulären (A, outside-out-Vesikel) bzw. mit der intrazellulären (B, inside-out-Vesikel) Seite des Rezeptors in Wechselwirkung tritt.

Der Rezeptor besitzt also an der Außenseite eine Calcium-Koordinationsstelle , die für die DHP-Bindung besetzt sein muß. Aus der Titrationskurve kann für Calcium eine Gleichgewichtskonstante im μM -Bereich abgelesen werden. Aus elektrophysiologischen Messungen wird eine Gleichgewichtskonstante von $0.7 - 2.0 \mu\text{M}$ vorausgesagt (Hille. B., 1984). was gut mit dem erhaltenen Titrationsergebnis übereinstimmt.

Im Gegensatz zur extrazellulären Seite (Calcium ist für die Bindung absolut notwendig), ist Calcium an der cytoplasmatischen Seite für die Bindung von Dihydropyridinen nicht notwendig (Abb. 30 B). Die Bindung des DHP-Antagonisten (PN 200-110) wird durch Calciumionen nicht beeinflusst. Die Bindung des DHP-Agonisten Bay K 8644 wird dagegen durch Calciumionen stimuliert. Der DHP-Rezeptor besitzt also an der cytoplasmatischen Seite eine Koordinationsstelle für Calcium, die zwischen Antagonist und Agonist diskriminieren kann.

Diskussion

Der DHP-Rezeptor wurde aus Kaninchen Skelettmuskelmembranen isoliert. Ausgehend von reinen t-Tubuli Membranen, die durch Ribi-Presse Behandlung oder Calciumphosphat Beladung einer Mikrosomen Fraktion präpariert wurden, wurde der Rezeptor durch eine relativ kurze Isolierungsmethode angereichert. Nach Solubilisierung in Digitonin und Chromatographie über WGA-Sepharose eluiert der DHP-Rezeptor von der nachfolgenden DEAE-Sephadex Säule mit einer Reinheit von 80% (Abb. 14). PAGE-Analyse der Rezeptor enthaltenden Fraktionen zeigt zwei hochmolekulare Peptide mit Molekulargewichten von 195 kDa (α -Untereinheit) und 148 kDa (β -Untereinheit). Weder nach Coomassie- noch nach Silber-Färbung (Abb. 13) sind zusätzliche Banden erkennbar. Der gereinigte Rezeptor enthält neben den beiden hochmolekularen Untereinheiten (α, β) keine weiteren kleinen Untereinheiten. Unter nicht reduzierenden Bedingungen ist nur eine einzige hochmolekulare Bande zu sehen, die vermutlich aus den Disulfid- verbrückten α - und β -Untereinheiten besteht. Das gemessene Molekulargewicht von ~ 300 kDa stimmt mit der Summe der beiden Untereinheiten ($\alpha + \beta = 340$ kDa) im Rahmen der Meßgenauigkeit überein. Die α -Untereinheit ist die DHP-bindende Komponente des Komplexes, da sie sich spezifisch mit ^3H -Azidopin markieren läßt (Abb. 17).

Der Skelettmuskel DHP-Rezeptor ist von verschiedenen Gruppen isoliert worden. Eine der β -Untereinheit vergleichbare Proteinkomponente wird in allen Präparationen gefunden. Aber erst in den neueren Arbeiten wird die Existenz einer zweiten hochmolekularen Untereinheit erkannt, die auf Grund ihrer Größe und ihrer Fähigkeit DHPs zu binden mit der α -Untereinheit vergleichbar ist. In Tabelle XI sind die bisher publizierten Molekulargewichte der DHP-Rezeptor Untereinheiten den in dieser Arbeit gefundenen gegenübergestellt. Neben den beiden hochmolekularen Polypeptiden (α, β) werden weitere kleine Peptide (γ, δ) als DHP-Rezeptor Untereinheiten postuliert.

Die DHP-bindende α -Untereinheit wurde erst spät als separate Untereinheit erkannt, da dieses Polypeptid extrem sensitiv für Degradationen ist. Der Abbau geht einher mit dem Auftreten von kleineren Peptiden, deren Molekulargewicht um 30 kDa liegt (eigene Ergebnisse). Selbst in der Originalarbeit von Curtis & Catterall (1984) ist eine schwache, diffuse Bande zu sehen, die aber nicht als Rezeptor-Komponente erkannt wurde. Größenmäßig würde diese Bande der α -Untereinheit entsprechen. Das diffuse, sehr breite Laufverhalten weist auf starke Degradation hin. Eine Ursache für diese Degradationserscheinungen liegt vermutlich in der Präparation des Ausgangs-

gewebes. Vaghy *et al.* (1987) konnte zeigen, daß das von einigen Autoren angewandte Verfahren, das Muskelfleisch vor der Homogenisierung einzufrieren und langsam auftauen zu lassen, zu dem selektiven Verlust der α -Untereinheit führt. Die β -Untereinheit wird durch diese Prozedur nicht fragmentiert.

Tabelle XI
Vergleich von DHP-Rezeptor Polypeptiden

DHP-Rezeptor Untereinheiten (kDa)					
α	β	γ	δ		
195	148			diese Arbeit	Skelettmuskel
	142		33, 32	Borsotto <i>et al.</i> , 1984	Skelettmuskel
	135	50	30	Curtis & Catterall, 1984	Skelettmuskel
	142, 122	56	31, 26, 22	Flockerzi <i>et al.</i> , 1986	Skelettmuskel
	155	65	32	Striessnig <i>et al.</i> , 1986	Skelettmuskel
170	150	52	32	Leung <i>et al.</i> , 1987	Skelettmuskel
155 - 170	130 - 150	50 - 65	30 - 35	Vaghy <i>et al.</i> , 1987	Skelettmuskel
165	130	55	32, 28	Sieber <i>et al.</i> , 1987	Skelettmuskel
175	143	54	30, 24 - 27	Takahashi <i>et al.</i> , 1987	Skelettmuskel
	142		30	Cooper <i>et al.</i> , 1987	Herzmuskel
		60, 54	34	Rengasamy <i>et al.</i> , 1985	Herzmuskel

Weiterhin zeigen Verdauungsexperimente mit V_8 -Protease und α -Chymotrypsin, daß sich die α -Untereinheit in stabile, DHP-bindende Spaltprodukte um 50 kDa und um 30 kDa fragmentieren läßt (Tabelle X). Diese Degradationsprodukte sind in ihrer Größe mit den als DHP-Rezeptor γ - und δ -Untereinheiten identifizierten Peptiden vergleichbar. Da diese Experimente unter nativen Bedingungen ausgeführt wurden, ist es möglich, daß intrinsische Proteasen während der Membran- oder Proteinisolierung ähnliche Fragmente produzieren, die als DHP-Rezeptor Untereinheiten isoliert wurden. Für den Natrium-Kanal ist proteolytische Degradation während der Isolierung

beschrieben (Casadei et al., 1986).

Neben den beschriebenen Abbaumechanismen, die durch Scherkräfte beim langsamen Auftauen des Muskelgewebes oder durch proteolytische Vorgänge zu einer Fragmentierung führen, kann die α -Untereinheit auch durch photolytische Prozesse degradiert werden (Abb. 22). Die Bestrahlung des Rezeptors in Gegenwart von Nimodipin führt zu einem Spaltprodukt, dessen Molekulargewicht von ~ 26 kDa mit dem der δ -Untereinheit verglichen werden kann.

Die Instabilität der α -Untereinheit, die auch die DHP-bindende Komponente des DHP-Rezeptors ist, erklärt wahrscheinlich die verschiedenen Molekulargewichte von 32 kDa bis 170 kDa, die für die DHP-bindenden Peptide berichtet wurden (Ferry et al., 1985; Galizzi et al., 1986; Campbell et al., 1984; Venter et al., 1983; Kirley & Schwartz, 1984; Ferry et al., 1987; Wernet et al., 1988). Vermutlich sind alle photoaffinitäts-markierten Peptide, die kleiner als die α -Untereinheit sind, entweder auf eine unspezifische Reaktion oder auf eine Degradation der α -Untereinheit zurückzuführen.

Die Arbeiten von Vandaele et al. (1987), Takahashi et al. (1987) und Sieber et al. (1987) zeigen ferner, daß die stabile β -Untereinheit über Disulfid-Bindungen mit einer kleinen δ -Untereinheit komplexiert ist. In der vorliegenden Arbeit kann dagegen gezeigt werden, daß die β -Untereinheit mit der instabilen, DHP-bindenden α -Untereinheit einen hochmolekularen Disulfid-verbrückten Komplex bildet (300 kDa), was durch Immunblot-Experimente mit monoklonalen anti-(β -Untereinheit)-Antikörpern verifiziert werden kann (Norman et al., 1987). Dieser Unterschied kann durch ein relativ einfaches Modell erklärt werden, unter der Annahme, daß die per se instabile α -Untereinheit einen *hot spot* Bereich für die Spaltung einer Peptidbindung enthält, der zu einem ~ 170 kDa und einem ~ 30 kDa Fragment führt (Abb. 31). Hinweise für einen solchen Bereich geben die Verdauungsexperimente mit V_8 -Protease und α -Chymotrypsin (Tabelle X) sowie die Bestrahlungsexperimente mit Nimodipin, wobei jeweils stabile Spaltprodukte um 30 kDa entstehen. Dieses Modell erklärt einerseits, weshalb in der vorliegenden Arbeit eine um ~ 20 - 30 kDa größere α -Untereinheit gefunden wurde (195 kDa gegenüber 165 - 175 kDa) und andererseits das Fehlen der kleinen δ -Untereinheiten.

Das von einigen Autoren gefundene, und als γ -Untereinheit bezeichnete Peptid (Tabelle XI) kann eine reale Komponente des Rezeptors sein, die aber in dieser Arbeit nicht gefunden wurde. Durch *peptide mapping* konnte gezeigt werden, daß dieses Peptid zumindest kein Abbauprodukt der α -Untereinheit ist (Leung et al., 1988).

Die Bindungseigenschaften des DHP-Rezeptors (α, β) verändern sich nach Solubilisierung und Isolierung nicht. Die Gleichgewichtskonstanten (K_D) für die

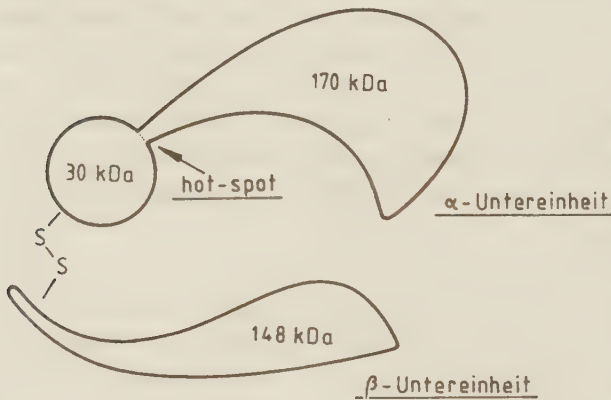


Abb. 31: Modell des DHP-Rezeptorkomplexes

Bindung von PN 200-110 an den membrangebundenen (Abb. 6 C) und an den isolierten (Abb. 14) Rezeptorkomplex sind unverändert (0,9 nM). Aber die Bindungswerte für den in der Literatur beschriebenen, vermutlich anverdauten Rezeptor (kleinere α -Untereinheit) werden durch die Solubilisierungs- und Isolierungsprozedur verändert. Die Affinität von PN 200-110 an den Rezeptor wird um den Faktor 5 - 10 schlechter (Flockerzi et al., 1986; Striessnig et al., 1986; Barhanin et al., 1987). Der fragmentierte Rezeptor bindet also nach wie vor DHPs, aber mit geringerer Spezifität. Markierungsexperimente mit Azidopin belegen, daß Fragmente der α -Untereinheit, die durch Silberfärbung nicht zu erkennen sind, DHP-Bindungs-

kapazität besitzen (Vaghy et al., 1987). Dieses Bindungsverhalten muß auch gefordert werden, da Rezeptor-Präparationen auch ohne α -Untereinheit (bzw. mit entsprechenden Abbauprodukten) DHP-Bindungsstellen aufweisen (Tabelle XI).

Neben der DHP-Bindung wurden weitere Bindungseigenschaften des gereinigten Rezeptors (α, β) untersucht und mit den Werten des membrangebundenen Rezeptors verglichen. Von Dihydropyridinen strukturell unterscheidbare Klassen von Calciumkanal-Antagonisten inhibieren ebenfalls DHP-sensitive Calciumkanäle im Skelettmuskel (Almers et al., 1985). Phenylalkylamine (Verapamil) und Benzothiazepine (Diltiazem) binden mit hoher Affinität an DHP-Rezeptoren (Glossmann et al., 1985; Galizzi et al., 1986). Sie beeinflussen durch Bindung an zwei distinkte Stellen (Garcia et al., 1986), die vermutlich auf der α -Untereinheit des Rezeptors liegen (Galizzi et al., 1986), über einen allosterischen Mechanismus (Murphy et al., 1983) die Bindung von Dihydropyridinen. Die Bindung von Diltiazem stimuliert die Bindung von DHPs und verlangsamt deren Dissoziation durch allosterische Wechselwirkungen, wogegen die Bindung von Verapamil die Bindung von DHPs inhibiert und deren Dissoziation beschleunigt. Die stimulierenden Effekte von Diltiazem und die inhibierenden Effekte von Verapamil ändern sich während der Aufarbeitung nicht (vergleiche Abb. 7 B und 15). Auch die Dissoziationskinetiken, die mit und ohne allosterische Modulatoren gemessen wurden, bleiben unverändert (Tabelle IX). Da der gereinigte DHP-Rezeptorkomplex (α, β) im Gegensatz zum membrangebundenen Rezeptor in Digitonin/Lipid-Vesikeln vorliegt, können die beobachteten marginalen Unterschiede einen Einfluß der Lipidumgebung widerspiegeln.

Die biochemischen Daten und die Bindungsdaten zeigen, daß der DHP-Rezeptorkomplex durch die Isolierungsprozedur nicht fragmentiert wurde. Er besteht aus zwei hochmolekularen Polypeptiden (α, β), die kovalent über Disulfidbindungen miteinander verbunden sind und einen Komplex von ~ 340 kDa bilden. Nur die α -Untereinheit besitzt DHP-Bindungskapazität. Tanabe et al. (1987) hat cDNA Klone sequenziert, die für die α -Untereinheit kodieren, und die Primärsequenz des Peptids abgeleitet. Daraus ergibt sich für die α -Untereinheit des DHP-Rezeptors ein Molekulargewicht von 212 kDa, was im Rahmen der Meßgenauigkeit mit dem in dieser Arbeit gefundenen Molekulargewicht von 195 kDa übereinstimmt. Sowohl die Aminosäuresequenz als auch die daraus abgeleitete Hydropathiestruktur ist homolog zur α -Untereinheit des Natriumkanals. Insbesondere sind die vorhergesagten Transmembransegmente, die

vermutlich eine essentielle Rolle im Ionentransport und in der spannungsabhängigen Regulation des Natriumkanals spielen (Noda et al., 1986; Catterall, 1986), im DHP-Rezeptor/Calciumkanal stark konserviert (Tanabe et al., 1987). Deshalb ist vermutlich die α -Untereinheit des DHP-Rezeptorkomplexes die wichtige strukturelle Komponente der transmembranösen Calciumkanalpore. Die native Form des DHP-sensitiven Calciumkanals ist ein dimerer Komplex aus einer zentralen α -Untereinheit, die vermutlich Träger der funktionellen Aktivitäten des Rezeptors ist, und einem assoziierten Polypeptid (β -Untereinheit), dessen Funktion noch unklar ist.

Der Calciumkanal-Proteinkomplex kann in mindestens drei funktionell unterscheidbaren Zuständen existieren (R = ruhend, O = offen, I = inaktiviert), die in einem spannungsabhängigen Gleichgewicht stehen (Hille, B., 1984). Andere regulatorische Mechanismen wie die Phosphorylierung oder bivalente Ionenkonzentrationen (Osterrieder et al., 1982; Lee & Tsien, 1983) können ebenfalls eine wichtige Rolle spielen. DHP-Antagonisten binden mit unterschiedlicher Affinität an die unterschiedlichen Konformationen des Calciumkanals. Bindungsstudien (Rogart et al., 1986; Schilling & Drewe, 1986) und *Voltage/Patch Clamp* Studien (Bean, 1984; Cognard et al., 1986) zeigen, daß DHPs mit hoher Affinität an den I-Zustand und mit niedriger Affinität an den R-Zustand des Calciumkanals binden. Weiterhin können von Calciumkanälen drei verschiedene Leitungszustände gemessen werden (ohne Öffnungen, mit kurzen Öffnungen und mit lang anhaltenden Öffnungen: Hess et al., 1984), aber nur einer dieser Leitungszustände (ohne Öffnungen) bindet DHP-Antagonisten mit hoher Affinität. Zusammengefaßt zeigen diese Ergebnisse, daß sich die DHP-Bindungsaffinität mit der spannungsabhängigen Konformation des DHP-Rezeptors ändert.

Die erwähnten elektrophysiologischen Experimente lassen vermuten, daß in Membranpräparationen, die im depolarisierten Zustand vorliegen (kein Membranpotential), mehr als eine Bindungsstelle für DHPs gefunden werden kann, vorausgesetzt, daß die Umwandlung zwischen hoch- und niederaffinen Seiten möglich ist. Die Scatchard-Analyse ist aber linear und zeigt neben der hochaffinen Bindung keine weitere Bindungsstelle (Abb. 6). Um eventuell vorhandene niederaffine Bindungsstellen zu markieren, hätten entsprechend hohe Konzentrationen an Ligand eingesetzt werden müssen. Bei hohen DHP-Konzentrationen dominiert aber die unspezifische Wechsel-

wirkung mit hydrophoben Membrankomponenten, wodurch eine mögliche niederaffine Bindung verdeckt wird bzw. unter den gegebenen Bedingungen nicht meßbar ist.

Im Gegensatz dazu sind die Ergebnisse von Assoziations- und Dissoziationsexperimenten an Hirnmembranen (Weiland & Oswald, 1985), Herzmembranen (Garcia et al., 1986) und Skelettmuskelfmembranen (Flockerzi et al., 1986 b; diese Arbeit, Abb. 8) durch einfache bimolekulare Prozesse nicht erklärbar. Die gemessenen Dissoziationskinetiken sind biphasisch. Eine schnelle und eine langsame Dissoziationskomponente weisen auf zwei verschiedene Bindungsstellen hin. Gleichzeitig verschiebt sich das Verhältnis von langsamer und schneller Dissoziation, wenn die Calciumkonzentration an der extrazellulären Seite erhöht wird. Steigende Konzentrationen von Calciumchlorid an der Außenseite des Rezeptors erhöhen den Anteil der stabileren DHP-Rezeptor Bindungsstelle (langsame Dissoziation). Der in Gegenwart von micromolaren CaCl_2 -Konzentrationen langsam dissoziierende Anteil von gebundenem ^3H -PN 200-110 (10 %) steigt auf 50 % in Gegenwart von millimolaren CaCl_2 -Konzentrationen (Tabelle IX). Diese Zunahme an stabiler Bindungskomponente zeigt sich ebenfalls in der Stimulierung der PN 200-110 Bindung durch steigende Mengen extrazellulärer Calciumkonzentrationen (Abb. 30). Es wäre möglich, daß eine niederaffine Form des DHP-Rezeptors (schnelle Dissoziation) durch Titration mit CaCl_2 in eine hochaffine Form (langsame Dissoziation) umgewandelt wird. Für den DHP-Rezeptor aus Herzmembranen ist eine derartige Umwandlung beschrieben (Ptasinski et al., 1985).

Die ionische Modulation der DHP-Bindung ist seit den Originalarbeiten von Fleckenstein (1977, Übersichtsartikel), die zu der Definition als Calcium-Antagonist führten, umstritten. Die Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration führt zu einer Abnahme der Kontraktionsinhibierung durch Calcium-Antagonisten in der glatten Muskulatur und im Herzmuskel. Elektrophysiologische Untersuchungen führen ebenfalls zu der Annahme eines kompetitiven Antagonismus zwischen Calcium und Calciumkanal-Antagonist (Lee & Tsien, 1983). Aber im Gegensatz zu diesen Ergebnissen zeigen Bindungsstudien mit DHPs ein uneinheitliches Bild. Es werden stimulierende, inhibierende und vernachlässigbare Effekte von Calcium oder Calcium-chelatoren auf die DHP-Bindung an den Rezeptor beschrieben (Janis & Triggle, 1984; Gould et al., 1982, 1984; Ptasinski et al., 1985; Galizzi et al., 1985; Fosset et al., 1983). Obwohl aus elektrophysiologischen Erkenntnissen seitenspezifische Effekte von

Calciumionen auf die Calcium-Antagonist-Bindung vorhergesagt werden können (Lee & Tsien, 1983; Hess et al., 1983), sind entsprechende Bindungsstudien bisher nicht durchgeführt worden. Die Schwierigkeiten liegen dabei in der selektiven Modifikation der Ionenkonzentration an der cytoplasmatischen bzw. extrazellulären Seite des DHP-Rezeptors.

In dieser Arbeit wurden Vesikel präpariert, die den DHP-Rezeptor in zwei verschiedenen Orientierungen enthalten, und dadurch die Untersuchung seiten-spezifischer Effekte erlauben. Das umgebende Inkubationsmedium kann einerseits mit der cytoplasmatischen und andererseits mit der extrazellulären Seite des Rezeptors in Wechselwirkung treten. Nach der Ribi-Press Methode präparierte t-Tubuli Membranvesikel enthalten den DHP-Rezeptor in der *inside-out* Orientierung, d.h. die cytoplasmatische Seite ist exponiert. Durch Solubilisierung in Digitonin entstehen dagegen Vesikel, die den Rezeptor in der *outside-out* Konfiguration enthalten, und deshalb an WGA-Matrix binden (Abb. 23). Der DHP-Rezeptor bindet in beiden Präparationen ^3H -PN 200-110 mit gleicher Affinität ($K_D = 0,9 \text{ nM}$). Die ^3H -PN 200-110 Bindung wird ebenfalls in beiden Präparationen gleichermaßen durch Verapamil inhibiert und durch Diltiazem stimuliert (Abb. 7 B und 15). Die Calcium-Antagonisten erreichen erwartungsgemäß ihre Bindungsstelle von beiden Seiten der Membran. Die Membran ist für sie keine Barriere, da sie lipidlöslich sind.

Seitenspezifische Effekte von anorganischen Ionen in den beiden Vesikelpräparationen sind nur meßbar, wenn die vorhandenen Kanalstrukturen in der Membran in einem geschlossenen Zustand vorliegen, was im depolarisierten Zustand der Vesikel (kein Membranpotential) auch angenommen wird.

Anorganische Blocker, die nicht permeabel sind (z.B. Cd^{2+}) und anorganische Agonisten, die permeabel sind (z.B. Ca^{2+} , Ba^{2+}) binden an eine gemeinsame Kation-Koordinationsstelle, die sich in der Nähe der extrazellulären Öffnung des Calciumkanals befindet (Hagiwara & Byerly, 1981). Die Wechselwirkung mit dieser Stelle wird als der erste Kontakt eines Ions mit dem Kanalprotein angesehen, das durch die Membran geschleust werden soll. Diese Stelle, die auch als Selektivitätsfilter bezeichnet wird, ist selektiv für Calcium gegenüber anderen mono- oder divalenten Kationen mit einer Dissoziationskonstanten im μM -Bereich (Tsien et al., 1987). Eine Dissoziationskonstante von $1 \mu\text{M}$ für die extrazelluläre Bindungsstelle kann auch aus

der Calcium-Titration der PN 200-110 Bindung (Abb. 29 B) abgeleitet werden. Daraus ergibt sich, daß vermutlich die gleiche Bindungsstelle, die für die Selektivität der Pore verantwortlich ist, auch die DHP(Agonist/Antagonist)-Bindung moduliert.

Calcium und Barium haben nach Bindung an die extrazelluläre Kation-Koordinationsstelle entgegengesetzte Effekte auf die DHP-Bindung (Abb. 29 B und D). Calcium stimuliert und Barium inhibiert bei gleichen Konzentrationen die DHP-Bindung. Angenommen, diese Effekte sind umkehrbar, d.h. DHPs stabilisieren die Bindung von Calcium an den Rezeptor stärker als von Barium, dann müßten DHP-Antagonisten den Calciumstrom durch Calciumkanäle stärker inhibieren als den Bariumstrom. Aber da Bariumionen an die Kation-Koordinationsstelle weniger stark binden als Calciumionen (Hagiwara & Byerly, 1981), sollte der Bariumfluß durch den Kanal auch stärker blockiert werden. Es konnte aber gezeigt werden, daß in der Tat der Calciumstrom durch Calciumkanal-Antagonisten stärker blockiert wird (Lee & Tsien, 1983). Da gleichzeitig die Blockade des Calciumstroms durch steigende Calciumkonzentrationen antagonisiert wurde, mußten die Autoren eine cytoplasmatische Calcium-Bindungsstelle postulieren, die für die Schwächung der Antagonist-Bindung verantwortlich ist. Der antagonistische Effekt von Calcium wurde aber erst bei solchen Konzentrationen beobachtet (mM), die hoch genug sind, die DHP-Bindung durch irgendwelche unspezifischen Wechselwirkungen zu destabilisieren (Abb. 29 B). Gleichzeitig führt ein erhöhter Calciumspiegel an der cytoplasmatischen Seite des Rezeptors ebenfalls zu einer Reduktion der DHP-Antagonist-Bindung (Vergl. Abb. 29 A). Die beobachteten makroskopischen Effekte der antagonistischen Aktionen von Calciumionen auf die Fähigkeit der DHPs Calciumkanäle zu blockieren, könnten auf eine gemeinsame Aktion einer erhöhten Calciumkonzentration auf beiden Seiten des Kanals zurückzuführen sein.

Im Gegensatz zur hochaffinen externen Calciumbindungsstelle ist die interne, auf cytolasmatischer Seite gelegene Bindungsstelle von niedriger Affinität (Abb. 29 A). Aus der Inhibierung der PN 200-110 Bindung läßt sich für Calcium eine Dissoziationskonstante von 1 mM ableiten. Sie entspricht in ihrer Größenordnung der in elektrophysiologischen Experimenten gefundenen Dissoziationskonstanten für die niederaffine Calciumbindungsstelle (10 mM, Hess & Tsien, 1984; Almers & McCleskey, 1984).

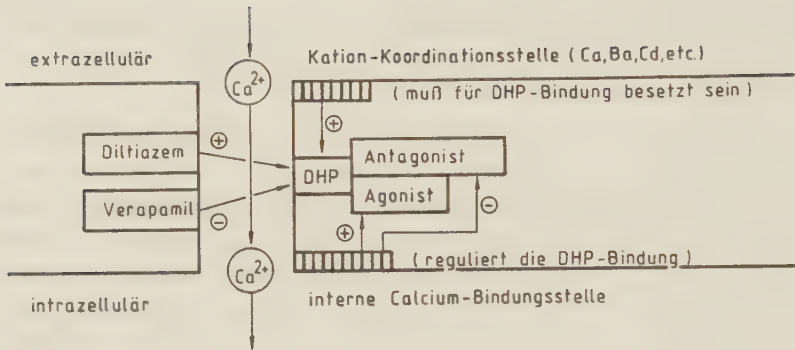


Abb. 32 : Schematische Darstellung des Calciumkanals, die die Wechselwirkung zwischen Calciumbindungsstellen und Calciumkanal-Antagonist/Agonist-Bindungsstellen zeigt. Anorganische Ionen (La^{3+} , Cd^{2+}) blockieren den Kanal durch Bindung an die äußere Kation-Koordinationsstelle (Hagiwara & Byerly, 1981). Organische Kanal-Blocker erreichen ihre Bindungsstelle vermutlich von der Innenseite der Membran (Hescheler et al., 1982). An der Innenseite liegt auch die Calciumbindungsstelle, die für die Modulation der DHP-Bindung verantwortlich ist (diese Arbeit). Die Agonist-Bindung wird stimuliert, die Antagonist-Bindung wird inhibiert. An der Außenseite muß eine Bindungsstelle, vermutlich die Kation-Koordinationsstelle, durch Calcium oder ein anderes bivalentes Ion (Ba^{2+} , Mg^{2+} , etc.) für die 1,4-DHP-Bindung besetzt sein (diese Arbeit). Die Calciumkanal-Antagonisten Diltiazem und Verapamil binden an distinkte Stellen und stimulieren bzw. inhibieren die DHP-Bindung (Murphy et al., 1983; diese Arbeit).

Die Wechselwirkung der DHP-Antagonisten mit dem Rezeptor wird durch die Bindung von Calcium an die hochaffine extrazelluläre oder an die niederaffine cytoplasmatische Bindungsstelle unterschiedlich reguliert. DHP-Agonisten zeigen ein Verhalten, daß nur teilweise mit dem der DHP-Antagonisten vergleichbar ist. Die äußere Calciumbindungsstelle muß besetzt sein, um DHP-Bindung zu ermöglichen (Abb. 30 A). Sowohl der Agonist (Bay K 8644) als auch der Antagonist (PN 200-110) binden nur in Gegenwart von Calcium. Die interne niederaffine Calciumbindungsstelle determiniert dagegen nicht die DHP-Bindung an sich (Abb. 30 B). Sie differenziert zwischen Agonist und Antagonist. Während die Bindung des Antagonisten durch steigende Calciumkonzentrationen inhibiert wird, stabilisiert Calcium die Bindung des Agonisten. Dieses unterschiedliche calciumabhängige Bindungsverhalten ist vermutlich die

Ursache für die entgegengesetzten physiologischen Wirkungen. Calciumkanal-Antagonisten und -Agonisten stabilisieren und binden dementsprechend an unterschiedliche Konformationen des Calciumkanals (Hess et al., 1984). Antagonisten stabilisieren einen nicht leitenden und deshalb geschlossenen Zustand des Kanals. Daraus läßt sich eine hohe Calciumkonzentration an der Außenseite und eine niedrige Konzentration an der Innenseite ableiten, was genau der Calciumverteilung für die maximale Antagonist-Bindung entspricht (vergl. Abb. 30). Andererseits stabilisieren Agonisten einen leitenden und deshalb offenen Zustand des Calciumkanals. Durch den entstehenden Calciumstrom erhöht sich vermutlich die interne Calciumkonzentration. Erwartungsgemäß wird die Agonist-Bindung durch cytoplasmatisches Calcium stabilisiert (vergl. Abb. 30).

Ein schematisches Diagramm der vermeintlichen Bindungsstellen für Calcium und Calciumkanal-Agonisten sowie -Antagonisten ist in Abb. 32 gezeigt.

Zusammenfassung

Der Dihydropyridin (DHP) - Rezeptor (vermutlich ein spannungsabhängiger Calciumkanal) wurde als hochmolekularer, 340 kDa Proteinkomplex in einer Reinheit von $\sim 80\%$ (2.4 nmol DHP-Rezeptor/mg Protein) aus Kaninchen-Skelettmuskel isoliert. T-Tubuli Membranen wurden durch Calciumphosphat-Beladung oder Ribipresse Behandlung einer Mikrosomenfraktion präpariert. Der DHP-Rezeptor wurde in 1% Digitonin solubilisiert und über Affinitäts- und Ionenaustauschchromatographie isoliert. Der gereinigte DHP-Rezeptor besteht aus zwei Peptiden mit Molekulargewichten von 195 kDa (α -Untereinheit) und 148 kDa (β -Untereinheit), die unter nicht-reduzierenden Bedingungen als ~ 300 kDa Komplex wandern.

Die α -Untereinheit läßt sich mit ^3H -Azidopin affinitätsmarkieren, und ist vermutlich Träger der DHP-Bindungsstelle. Sie ist im Gegensatz zur β -Untereinheit extrem degradationsempfindlich. Proteolyse und Photolyse führen zu ~ 30 kDa Fragmenten.

Die DHP-Bindungseigenschaften, sowie deren allosterische Modulation durch Verapamil und Diltiazem bleiben durch die Aufreinigung unverändert.

Es wurden Vesikel präpariert, die den Rezeptor in einer *inside-out* (t-Tubuli Membranen) bzw. in einer *outside-out* (Digitonin-Vesikel) Orientierung enthalten. Die Orientierung des Rezeptors hat keinen Einfluß auf die generellen DHP-Bindungseigenschaften, aber die intra- bzw. extrazellulären Ionenkonzentrationen beeinflussen die Bindung.

Die Besetzung einer hochaffinen Calciumbindungsstelle ($K_D \sim \mu\text{M}$) an der extrazellulären Seite des DHP-Rezeptors ist für die DHP-Bindung absolut notwendig. Sowohl DHP-Agonisten als auch DHP-Antagonisten verlieren ihre Bindungsaffinität an den Rezeptor in Abwesenheit von Calcium.

Eine Calciumbindungsstelle geringerer Affinität ($K_D \sim \text{mM}$) an der cytoplasmatischen Seite des Rezeptors determiniert nicht über die DHP-Bindung an sich. Diese interne Calciumbindungsstelle diskriminiert zwischen DHP-Agonist und DHP-Antagonist. Während die Bindung des DHP-Agonisten durch internes Calcium stimuliert wird, destabilisiert Calcium die Bindung des DHP-Antagonisten.

Literaturverzeichnis

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J. D. (1983)
The Molecular Biology of the Cell (Garland Publishing Inc., New York)
- Almers, W. & McCleskey, E. W. (1984)
J. Physiol. **353** 585 - 608
- Almers, W., McCleskey, E. W. & Palade, P. T. (1984)
J. Physiol. **353** 565 - 583
- Almers, W., McCleskey, E. W. & Palade, P. T. (1985)
in *Calcium in Biological Systems* (Rubin, R. P., Weiss, G. B. und Putney, J. W., Ed.)
321 - 330, Plenum Publishing Corp., New York, London
- Akerman, K. E. O. & Nicholls, D. G. (1983)
Trends Biochem. Sci. **8** 63 - 64
- Baker, P. F. & Knight, D. E. (1984)
Trends Neurosci. **7** 120 - 126
- Barhanin, J., Coppola, T., Schmid, A., Borsotto, M. & Lazdunski, M. (1987)
Eur. J. Biochem. **164** 525 - 531
- Baumann, A., Krah-Jentgens, I., Müller, R., Müller-Holtkamp, F., Seidel, R.,
Kecskemethy, N., Casal, J., Ferrus, A. & Pongs, O. (1987)
EMBO J. **6** 3419 - 3429
- Bean, B. P. (1984)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81** 6388 - 6392
- Bellemann, P. (1985)
in: *Membranes and Muscle* : Berman, M. C., Gevers, W., Opie, L., Packer, L. (Hrsg.),
IRL Press, Oxford, UK, Washington DC. 11 - 34
- Bellemann, P., Ferry, D., Lübbecke, F. & Glossmann, H. (1981)
Arzneim.-Forsch. **31** 2064 - 2067
- Bellemann, P., Schade, A. & Towart, R. (1983)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80** 2356 - 2360
- Betz, H. (1987)
Trends Neurosci. **10** 113 - 117
- Bradford, M. M. (1976)
Anal. Biochem. **72** 248 - 254
- Borsotto, M., Norman, R.I., Fosset, M. & Lazdunski, M. (1984 a)
Eur. J. Biochem. **142** 449 - 455
- Borsotto, M., Barhanin, J., Norman, R. I. & Lazdunski, M. (1984 b)
Biochem. Biophys. Res. Commun. **122** 1357 - 1366
- Borsotto, M., Barhanin, J., Fosset, M. & Lazdunski, M. (1985)
J. Biol. Chem. **260** 14255 - 14263
- Branton, D., Cohen, C. M. & Tayler, J. (1981)
Cell **24** 24 - 32

- Campbell, K. P., Lipshutz, G. M. & Denney, G. H. (1984)
J. Biol. Chem. **259** 5384 - 5387
- Catterall, W. A. (1986)
Ann. Rev. Biochem. **55** 953 - 985
- Cognard, C., Romey, G., Galizzi, J.-P., Fosset, M. & Lazdunski, M. (1986)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83** 1518 - 1522
- Cooper, C. L., Vandaele, S., Barhanin, J., Fosset, M., Lazdunski, M. & Hosey, M. (1987)
J. Biol. Chem. **262** 509 - 512
- Curtis, B. M. & Catterall, W. A. (1983)
J. Biol. Chem. **258** 7280 - 7283
- Curtis, B. M. & Catterall, W. A. (1984)
Biochemistry **23** 2113 - 2118
- Dzandu, J. K., Deh, M. E., Barratt, D. L. & Wise, G. E. (1984)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81** 1733 - 1737
- Eckert, R. & Brehm, P. (1979)
Am. Rev. Biophys. Bioeng. **8** 353 - 383
- Ehlert, F. J., Itoga, E., Roeske, W. R. & Yamamura, H. I. (1982)
Biochem. Biophys. Res. Commun. **104** 937 - 943
- Fatt, P. & Katz, B. (1953)
J. Physiol. **120** 171 - 204
- Ferry, D. R. & Glossmann, H. (1982)
FEBS Lett. **148** 331 - 337
- Ferry, D. R., Rombusch, M., Goo, A. & Glossmann, H. (1984)
FEBS Lett. **169** 112 - 118
- Ferry, D. R., Kämpf, K., Goll, A. & Glossmann, H. (1985)
EMBO J. **4** 1933 - 1940
- Ferry, D. R., Goll, A. & Glossmann, H. (1987)
Biochem. J. **243** 127 - 135
- Fleckenstein, A. (1977)
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. **17** 149 - 166
- Flockerzi, V., Oeken, H.-J. & Hofmann, F. (1986 a)
Eur. J. Biochem. **161** 217 - 224
- Flockerzi, V., Oeken, H.-J., Hofmann, F., Pelzer, D., Cavaliè, A. & Trautwein, W. (1986 b)
Nature (London) **323** 66 - 68
- Fosset, M., Jaimovich, E., Delpont, E. & Lazdunski, M. (1983)
J. Biol. Chem. **258** 6086 - 6092
- Galizzi, J.-P., Fosset, M. & Lazdunski, M. (1985)
Biochem. Biophys. Res. Commun. **132** 49 - 55
- Galizzi, J.-P., Borsotto, M., Barhanin, J., Fosset, M. & Lazdunski, M. (1986)
J. Biol. Chem. **261** 1393 - 1397
- Gallagher, J. T., Morris, A. & Dexter, T. M. (1985)
Biochem. J. **231** 115 - 122

- Garcia, M., King, V., Siegl, P., Reuben, J. & Kaczorowski, G. (1986)
J. Biol. Chem. **261** 8146 - 8157
- Glossmann, H., Ferry, D. R., Goll, A., Striessnig, J. & Zernig, G. (1985 a)
Arzneim.-Forschung/Drug Res. **35** 1917 - 1935
- Glossmann, H., Ferry, D. R., Goll, A., Striessnig, J. & Schober, M. (1985 b)
J. Cardiovasc. Pharmacol. **7** 520 - 530
- Goll, A., Ferry, D. R. & Glossmann, H. (1983)
FEBS Lett. **157** 63 - 69
- Goldberg, N. D. (1975)
in *Cell Membranes : Biochemistry, Cell Biology and Pathology*, Weissman, G. & Clairborne, R. Hrsg. (New York, Hospital Practica Publishing Co.)
- Gould, R. J., Murphy, K. M. M. & Snyder, S. H. (1982)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79** 3656 - 3660
- Gould, R. J., Murphy, K. M. M. & Snyder, S. H. (1984)
Mol. Pharmacol. **25** 235 - 241
- Grenningloh, G., Rienitz, A., Schmitt, B., Methfessel, C., Zensen, M., Beyreuther, K., Gundelfinger, E. D. & Betz, H. (1987)
Nature (London) **328** 215 - 220
- Gronemeyer, H. & Pongs, O. (1980)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77** 2108 - 2112
- Hagiwara, S. & Byerly, L. (1981)
Ann. Rev. Neurosci. **4** 69 - 125
- Hescheler, J., Pelzer, D., Trube, G. & Trautwein, W. (1982)
Pflügers Arch. **393** 287 - 291
- Hess, P., Lee, K. A. & Tsien, R. W. (1983)
Biophys. J. **41** 394a
- Hess, P., Lansman, J. B. & Tsien, R. W. (1984)
Nature (London) **311** 538 - 544
- Hess, P. & Tsien, R. W. (1984)
Nature (London) **309** 453 - 456
- Hill, A. V. (1910)
J. Physiol. **40** 4 - 7
- Hille, B. (1984)
Ionic Channels of Excitable Membranes (Sunderland, Mass: Sinauer)
- Hirano, H., Parkhouse, B., Nicolson, G. L., Lennox, E. S. & Singer, S. J. (1972)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **69** 2945 - 2949
- Hucho, F. (1986)
Eur. J. Biochem. **158** 211 - 226
- Hurwitz, L. (1986)
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. **26** 225 - 258
- Janis, R. A., Bellemann, P., Sarmiento, J. G. & Triggle, D. J. (1985)
in: *Cardiovascular Effects of Dihydropyridine-Type Calcium Antagonists and Agonists* (Bayer-Symposium IX, Springer-Verlag Berlin Heidelberg)
140 - 155

Janis, R. A. & Triggle, D. J. (1984)
Drug Dev. Res. **4** 257 - 274

Kandel, E. R. (1981)
Nature (London) **293** 697 - 700

Kirley, T. L. & Schwartz, A. (1984)
Biochem. Biophys. Res. Commun. **123** 41 - 49

Kubo, T., Fukuda, K., Mikami, A., Maeda, A., Takahashi, H., Mishina, M., Kojima, M., Matsuo, H., Hirose, T. & Numa, S. (1986)
Nature (London) **323** 411 - 416

Kyte, J. & Doolittle, R. F. (1982)
J. Mol. Biol. **157** 105 - 132

Laemmli, U. K. (1970)
Nature (London) **227** 680 - 685

Lai, F. A., Erickson, H. P., Rousseau, E., Liu, Q.-Y. & Meissner, G. (1988)
Nature (London) **331** 315 - 319

Laskey, R. A. (1980)
Methods Enzymol. **65** 363 - 371

Lau, Y. H., Caswell, A. H. & Brunschwig, J.-P. (1977)
J. Biol. Chem. **252** 5565 - 5574

Lee, K. S. & Tsien, R. W. (1983)
Nature (London) **302** 790 - 794

Leung, A. T., Imagawa, T. & Campbell, K. P. (1987)
J. Biol. Chem. **262** 7943 - 7946

Leung, A. T., Imagawa, T., Block, B., Franzini-Armstrong, C. & Campbell, K. P. (1988)
J. Biol. Chem. **263** 994 - 1001

De Meis, L. & Hasselbach, W. (1971)
J. Biol. Chem. **246** 4759 - 4763

Merril, C. R., Goldman, D., Sedman, S. A. & Ebert, M. H. (1981)
Science **211** 1437 - 1438

Murphy, K. M. M., Gould, R. J., Largent, B. L. & Snyder, S. H. (1983)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80** 860 - 864

Nalik, P. (1984)
Diplomarbeit, Ruhr Universität Bochum

Nernst, W. (1888)
Z. Phys. Chem. 613 - 637

Nilius, B., Hess, P., Lansman, J. B. & Tsien, R. W. (1985)
Nature (London) **316** 443 - 446

Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T., Ikeda, T., Takahashi, H., Nakayama, H., Kanaoka, Y., Minamino, N., Kangawa, K., Matsuo, H., Raftery, M. A., Hirose, T., Inayama, S., Hayashida, H., Miyata, T. & Numa, S. (1984)
Nature (London) **312** 121 - 127

Noda, M., Ikeda, T., Kayano, T., Suzuki, H., Takeshima, H., Kurasaki, M., Takahashi, H. & Numa, S. (1986)
Nature (London) **320** 188 - 192

- Noll, H. (1967)
Nature (London) **215** 360 - 363
- Norman, R. I., Burgess, A. J., Allen, E. & Harrison, T. M. (1987)
FEBS Lett. **212** 127 - 132
- Nowicky, M. C., Fox, A. P. & Tsien, R. W. (1985)
Nature (London) **316** 440 - 443
- Olivera, B. M., McIntosh, J. M., Cruz, L. J., Luque, F. A. & Gray, W. R. (1984)
Biochemistry **23** 5087 - 5090
- Olivera, B. M., Gray, W. R., Zeikus, R., McIntosh, J. M., Varga, J., Rivier, J., de Santos, V. & Cruz, L. J. (1985)
Science **230** 1338 - 1343
- Osterrieder, W., Brum, G., Hescheler, J., Trautwein, W., Flockerzi, V. & Hofmann, F. (1982)
Nature (London) **298** 576 - 578
- Overton, E. (1902)
Pflügers Arch. **92** 115 - 280
- Palumbo, G. & Tecce, M. F. (1983)
Anal. Biochem. **134** 254 - 258
- Podolsky, R. J. (1975)
Fed. Proc. **34** 1374 - 1378
- Ptasienski, J., McMahon, K. K. & Hosey, M. M. (1985)
Biochem. Biophys. Res. Commun. **129** 910 - 917
- Rengasamy, A., Ptasienski, J. & Hosey, M. M. (1985)
Biochem. Biophys. Res. Commun. **126** 1 - 7
- Reuter, H. (1983)
Nature (London) **301** 569 - 574
- Ringsdorf, H., Schlarb, B. & Venzmer, J. (1988)
Angew. Chem. **100** 117 - 162
- Rios, E. & Brum, G. (1987)
Nature (London) **325** 717 - 720
- Roseblatt, M., Hidalgo, C., Vergara, C. & Ikemoto, N. (1981)
J. Biol. Chem. **256** 8140 - 8148
- Rogart, R. B., deBruyn Kops, A. & Dzau, V. J. (1986)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83** 7452 - 7456
- Rosenberger, L. B. & Triggle, D. J. (1977)
 in *Calcium and Drug Action* (Weiss, G. B., ed) pp. 3-31, Plenum Press, New York
- Rüegg, J. C. (1987)
Naturwissenschaften **74** 579 - 584
- Ruth, P., Flockerzi, V., v. Nettelblatt, E., Oeken, J. & Hofmann, F. (1985)
Eur. J. Biochem. **150** 313 - 322
- Scatchard, G. (1949)
Ann. N. Y. Acad. Sci. **51** 660 - 672

Schilling, W. P. & Drewe, J. A. (1986)
J. Biol. Chem. **261** 2750 - 2758

Schofield, P. R., Darlison, M. G., Fujita, N., Burt, D. R., Stephenson, F. A.,
Rodriguez, H., Rhee, L. M., Ramachandran, J., Reale, V., Glencorse, T. A.,
Seeburg, P. H. & Barnard, E. A. (1987)
Nature (London) **328** 221 - 227

Schwartz, L. M., McCleskey, E. W. & Almers, W. (1985)
Nature (London) **314** 747 - 751

Shamoo, A. E. (1985)
in *Current Topics in Membranes and Transport*. Bronner, F. Hrsg., (Academic Press,
Inc.), 1 - 7

Sieber, M., Nastainczyk, W., Zubor, V., Wernet, W. & Hofmann, F. (1987)
Eur. J. Biochem. **167** 117 - 122

Singer, S. J. & Nicolson, G. L. (1972)
Science **175** 720 - 731

Somlyo, A. P. (1984)
Nature (London) **309** 516 - 517

Spedding, M. (1987)
Trends Pharmacol. Sci. **8** 115 - 117

Stephenson, F. A. (1988)
Biochem. J. **249** 21 - 32

Stone, P. A., Antman, E. M., Muller, J. E. & Braunwald, E. (1980)
Ann. Int. Med. **93** 886 - 904

Striessnig, J., Moosburger, K., Goll, A., Ferry, D. R. & Glossmann, H. (1986)
Eur. J. Biochem. **161** 603 - 609

Takahashi, M., Seagar, M. J., Jones, J. F., Reber, B. F. X. & Catterall, W. A.
(1987)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84** 5478 - 5482

Tanabe, T., Takeshima, H., Mikami, A., Flockerzi, V., Takahashi, H., Kangawa, K.,
Kojima, M., Matsuo, H., Hirose, T. & Numa, S. (1987)
Nature (London) **328** 313 - 318

Tanford, C. & Reynolds, J. A. (1976)
Biochim. Biophys. Acta **457** 133 - 170

Taylor, C. W. (1985)
Comp. Biochem. Physiol. **82A/2** 249 - 255

Timpe, L. C., Schwarz, T. L., Tempel, B. L., Papazian, D. M., Jan, Y. N. & Jan, L. Y.
(1988)
Nature (London) **331** 143 - 145

Triggle, D. J. & Janis, R. A. (1984)
J. Cardiovasc. Pharmacol. **6** 950 - 956

Tsien, R. W. (1983)
Ann. Rev. Physiol. **45** 341 - 358

Tsien, R. W., Hess, P., McCleskey, E. W. & Rosenberg, R. L. (1987)
Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem. **16** 265 - 290

Vaghy, P. L., Striessnig, J., Miwa, K., Knaus, H.-G., Itagaki, K., McKenna, E.,
Glossmann, H., & Schwartz, A. (1987)
J. Biol. Chem. **262** 14337 - 14342

Vandaele, S., Fosset, M., Galizzi, J.-P. & Lazdunski, M. (1987)
Biochem. **26** 5 - 9

Venter, J. C., Fraser, C. M., Schaber, J. S., Jung, C. Y., Bolger, G. & Triggle, D. J.
J. Biol. Chem. **258** 9344 - 9348

Weiland, G. A. & Oswald, R. E. (1985)
J. Biol. Chem. **260** 8456 - 8464

Wernet, W., Sieber, M., Landgraf, W. & Hofmann, F. (1988)
Eur. J. Biochem. **172** 233 - 238

Yellen, G. (1987)
Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem. **16** 227 - 246

Lebenslauf

12. 09. 1956 geboren in Berlin
- 1963 - 1967 Besuch der 13. Grundschule in Berlin
- 1967 - 1969 Besuch der Kronach-Übergangsschule in Berlin
- 1969 - 1972 Besuch der Lilienthal-Oberschule in Berlin
- 1972 - 1976 Besuch des Ernst-Moritz-Arndt-Gymnasiums in Remscheid
01. 06. 1976 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife am
Ernst-Moritz-Arndt-Gymnasium
- 1976 - 1983 Studium der Chemie an der Ruhr-Universität Bochum
- 1983 - 1984 Anfertigung der Diplomarbeit am Lehrstuhl für Biochemie
der Fakultät für Chemie bei Prof. Dr. Olaf Pongs
30. 05. 1984 Diplom-Hauptprüfung in Chemie
- 1984 - 1988 Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl für
Biochemie der Fakultät für Chemie bei Prof. Dr. Olaf Pongs

Veröffentlichung

Kanngießer, U., Nalik, P. & Pongs, O. (1988)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 2969 - 2973

